

## Thèse de Doctorat

Laurence DALLEY

Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
**grade de Docteur de l'Université de Nantes**

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

**École doctorale** : Biologie Santé Nantes Angers

**Discipline** : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

**Spécialité** : Biologie des organismes

**Unité de recherche** : CRCINA, UMR 1232, 8 Quai Moncousu 44000 Nantes

CBMN, UMR 5248, Allée Geoffroy Saint Hilaire B14 33600 Pessac

**Soutenue le Jeudi 18 Mai 2017**

# Caractérisation et compréhension du mécanisme des nanovecteurs pour la délivrance intracellulaire de macromolécules bioactives

## JURY

Rapporteurs :	<b>Dr. Marie-Pierre ROLS</b> , Directeur de recherches, CNRS, Toulouse
	<b>Dr. Patrick MOREAU</b> , Directeur de Recherches, CNRS, Bordeaux
Président du jury :	<b>Pr. Philippe BARTHELEMY</b> , Professeur, Université de Bordeaux, Bordeaux
Directeur de Thèse :	<b>Dr. Bruno PITARD</b> , Directeur de recherches, CNRS, Nantes
Co-directeur de Thèse :	<b>Dr. Olivier LAMBERT</b> , Directeur de recherches, CNRS, Bordeaux





## Thèse de Doctorat

Laurence DALLEY

Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
**grade de Docteur de l'Université de Nantes**

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

**École doctorale** : Biologie Santé Nantes Angers

**Discipline** : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

**Spécialité** : Biologie des organismes

**Unité de recherche** : CRCINA, UMR 1232, 8 Quai Moncoussu 44000 Nantes

CBMN, UMR 5248, Allée Geoffroy Saint Hilaire B14 33600 Pessac

**Soutenu le Jeudi 18 Mai 2017**

# Caractérisation et compréhension du mécanisme des nanovecteurs pour la délivrance intracellulaire de macromolécules bioactives

## JURY

Rapporteurs :	<b>Dr. Marie-Pierre ROLS</b> , Directeur de recherches, CNRS, Toulouse
	<b>Dr. Patrick MOREAU</b> , Directeur de Recherches, CNRS, Bordeaux
Président du jury :	<b>Pr. Philippe BARTHELEMY</b> , Professeur, Université de Bordeaux, Bordeaux
Directeur de Thèse :	<b>Dr. Bruno PITARD</b> , Directeur de recherches, CNRS, Nantes
Co-directeur de Thèse :	<b>Dr. Olivier LAMBERT</b> , Directeur de recherches, CNRS, Bordeaux







## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je tiens à remercier Mme Marie-Pierre Rols et Mr Patrick Moreau d'être les rapporteurs de mon manuscrit, et Mr Philippe Barthélémy d'être examinateur de mon travail.

Je voudrais tout particulièrement remercier mes deux directeurs de thèse. Tout d'abord, Bruno Pitard pour m'avoir accompagné durant ces travaux et m'avoir transmis ses connaissances sur la vectorisation de molécules biologiques. Je tiens également à remercier, mon co-directeur de thèse, Olivier Lambert qui m'a guidé, et surtout qui m'a fait découvrir et aimer la microscopie électronique à transmission. Je les remercie tous les deux pour la confiance qu'ils m'ont témoigné tout au long de ces années et pour tous leurs conseils et remarques constructives.

Je voudrais ensuite remercier tout particulièrement Marion Decossas pour m'avoir livré tous les secrets des techniques de microscopies et d'avoir toujours été d'un soutien au cours de ces trois ans. Merci également à Annelise Sahin pour ses précieux conseils modes ainsi que scientifiques. Merci à l'ensemble des collègues de l'équipe d'architecture de complexes membranaires et processus cellulaires : Marie-Christine Gerbod-Giannone, Sylvie Poussard, Elise Dargelos, Laetitia Daury, Jean-Christophe Taveau. Je remercie aussi Julien pour ces fameuses crêpes, Céline et toutes les autres personnes du CBMN que j'ai côtoyées pendant ces années de thèse.

Merci à mes collègues de Nantes : Julie, Thibault, Thomas et Pauline. Même si je n'étais pas souvent avec vous, c'était toujours un plaisir de venir et de pouvoir discuter.

Je remercie également tous les collaborateurs : Damien Habrant pour la synthèse des lipides cationiques, Sophie Lecomte pour m'avoir fourni le savoir-faire pour l'ATR-FTIR, Anneke Kremer, Christopher Guérin, Monika Hollenhorst et Aleksander Edelman pour m'avoir accueilli quelques jours et pour nos échanges scientifiques.

Je souhaite remercier tout particulièrement Christelle Fleury qui a été mon pilier ces trois années. J'ai toujours pu compter sur toi et notamment ces derniers mois. Merci de nous avoir fait partager les nombreux desserts préparés par tes soins. On a passé d'innombrables moments à parler mode, tricot, coiffure et élaborer de nouvelles recettes. Un remerciement spécial pour Véra de chez Sugary pour nous avoir accueillis et nourris pendant la rédaction.

Je voudrais par ailleurs remercier mes collègues et particulièrement les anciens : Alexis, Grégoire, Emilie, Tiphaine, Clémence, Marie-Lise, Sarah, Jade, Romain, Denis, Marion, Merian, Bérénice, John et François qui ont été là dès le début et qui m'ont continuellement soutenu. Merci également à la nouvelle génération : Lucie, Cécile, Marie, Dimitri, Antoine et Ghita.

Enfin, je remercie mes amis qui ont été là dans les moments de détente : Marie, Jérémy, Charlotte, Andréa, Pierre-Yves, Laure, Julie et Estelle. Les amis, merci pour ces excellents moments passés avec vous et ces innombrables soirées.

Un grand merci à ma famille et plus particulièrement à mes parents qui m'ont toujours soutenu tout au long de mes études et sans qui rien n'aurait été possible. Vous avez toujours été là et n'avez jamais cessé de croire en moi. Je serai éternellement reconnaissant de tout ce que vous avez fait.

Merci à tous

# Sommaire

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>7</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES FIGURES.....</b>	<b>9</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>15</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>23</b>
<b>GENERALITES .....</b>	<b>27</b>
CHAPITRE 1 : DELIVRANCE INTRACELLULAIRE D'ACIDES NUCLEIQUES .....	27
<i>A. Thérapie génique.....</i>	<i>27</i>
<i>B. Systèmes de délivrance .....</i>	<i>28</i>
1. Méthodes physiques.....	30
2. Vecteurs viraux .....	31
3. Vecteurs synthétiques .....	33
<i>C. Essais cliniques .....</i>	<i>34</i>
CHAPITRE 2 : DELIVRANCE INTRACELLULAIRE DE PROTEINES .....	36
<i>A. Thérapie protéique .....</i>	<i>36</i>
<i>B. Méthodes de délivrance .....</i>	<i>38</i>
1. Méthodes physiques.....	39
2. Internalisation de complexes protéiques.....	40
a. Domaines de transduction protéiques .....	40
b. Particules de types virus (VLPs) .....	41
c. Immunotoxines.....	41
3. Vecteurs synthétiques .....	43
CHAPITRE 3 : VECTEURS SYNTHETIQUES .....	45
<i>A. Polymères .....</i>	<i>45</i>
1. Polyéthylénimine (PEI).....	45
2. Poly L-lysine (PLL).....	46
3. Chitosanes .....	47

4.	Cyclodextrines .....	47
5.	Dendrimères .....	48
6.	Copolymères à blocs .....	49
<b>B.</b>	<b><i>Lipides cationiques</i></b> .....	<b>50</b>
1.	Structure .....	50
a.	Tête cationique.....	51
b.	Queue hydrophobe .....	51
c.	Bras espaceur .....	52
2.	Caractérisation physico-chimiques .....	53
a.	Taille des lipoplexes.....	53
b.	Complexation .....	55
c.	Morphologie et structure .....	56
<b>C.</b>	<b><i>Mécanisme d'action</i></b> .....	<b>57</b>
1.	Internalisation.....	58
a.	Phagocytose .....	59
b.	Pinocytose .....	59
i.	Macropinocytose .....	60
ii.	Voie dépendante de la clathrine (CME).....	60
iii.	Voie dépendante des cavéoles (CvME) .....	61
2.	Echappement endosomal .....	62
a.	Eponge à protons .....	62
b.	Mécanisme de « flip-flop » .....	63
c.	Agents d'échappement endosomal .....	65
3.	Trafic intracellulaire du plasmide et importation nucléaire .....	66
	<b>CHAPITRE 4 : DERIVES LIPIDIQUES D'AMINOGLYCOSIDES.....</b>	<b>68</b>
<b>A.</b>	<b><i>Description</i></b> .....	<b>68</b>
<b>B.</b>	<b><i>Etudes</i></b> .....	<b>72</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>79</b>
<b>A.</b>	<b><i>Formulations lipidiques</i></b> .....	<b>79</b>
<b>B.</b>	<b><i>Formulation des complexes lipides/protéine</i></b> .....	<b>79</b>
<b>C.</b>	<b><i>Culture cellulaire</i></b> .....	<b>80</b>
<b>D.</b>	<b><i>Délivrance intracellulaire de la protéine</i></b> .....	<b>80</b>
<b>E.</b>	<b><i>Coloration négative</i></b> .....	<b>81</b>



F. <i>Cryo-microscopie électronique à transmission</i> .....	81
G. <i>Microscopie corrélative</i> .....	82
H. <i>Microscopie électronique à balayage avec sonde ionique focalisée (FIB-SEM)</i> .....	84
I. <i>Test de viabilité cellulaire</i> .....	85
J. <i>Inhibition des voies d'endocytose</i> .....	85
K. <i>siRNA Cav-1</i> .....	86
L. <i>Western blot</i> .....	86
1. Préparation extraits protéiques .....	86
2. Electrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	87
3. Transfert des protéines.....	87
4. Détection immunologique des protéines.....	87
M. <i>Cytométrie en flux</i> .....	88
N. <i>Immunofluorescence</i> .....	88
1. Cav-1.....	88
2. CFTR et K8.....	89
O. <i>Préparation des lipides anioniques</i> .....	89
P. <i>Spectroscopie IRTF en mode ATR</i> .....	89
Q. <i>Analyses statistiques</i> .....	90
<b>RESULTATS</b> .....	<b>96</b>
CHAPITRE 1 : ETUDE DE L'INFLUENCE DU BRAS ESPACEUR DES VECTEURS LIPIDIQUES DERIVES D'AMINOGLYCOSIDES POUR LA DELIVRANCE D'ACIDES NUCLEIQUES .....	96
CHAPITRE 2 : FORMULATION DE LIPIDES CATIONIQUES POUR LA DELIVRANCE INTRACELLULAIRE DE PROTEINES .....	154
CHAPITRE 3 : ETUDE DU MECANISME DE DELIVRANCE DE PROTEINES .....	168
A. <i>Criblage de différents lipides cationiques</i> .....	169
B. <i>Caractérisation morphologique des complexes par ME</i> .....	173
1. Caractérisation des complexes par coloration négative .....	173
2. Caractérisation des complexes par cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-MET).....	175
C. <i>Délivrance et distribution des anticorps</i> .....	176
1. Cinétique de la délivrance des anticorps .....	176
2. Visualisation en 3D de la répartition de l'anticorps par FIB-SEM .....	178

3. Distribution des anticorps par microscopie corrélative .....	180
<i>D. Mécanisme d'internalisation et de délivrance .....</i>	<i>183</i>
1. Voies d'endocytoses .....	183
2. Echappement endosomal .....	187
<i>E. Application thérapeutique.....</i>	<i>189</i>
1. Colocalisation du CFTR et de K8.....	190
2. Délivrance de K8 via DOPRI et marquage du CFTR.....	191
<b>DISCUSSION &amp; PERSPECTIVES.....</b>	<b>197</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>213</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>231</b>
ANNEXE 1: MARQUEURS DES VOIES D'ENDOCYTOSES.....	231
ANNEXE 2 : SPECTRES D'ATR-FTIR .....	232
ANNEXE 3 : WESTERN BLOT .....	234
ANNEXE 4 : ARTICLE 5.....	235

## Table des figures

Figure 1 : Types de maladies pour les essais cliniques de thérapie génique (D'après Ginn et al., 2013).....	27
Figure 2 : Voies de la thérapie génique.....	28
Figure 3 : Types de vecteurs utilisés pour les essais cliniques de thérapie génique (D'après Ginn et al., 2013) .....	30
Figure 4 : Nombres d'essais cliniques de thérapie génique dans le monde entre 1989 et 2014 (D'après Villate-Beitia et al., 2015). .....	35
Figure 5 : Marché des protéines recombinantes et leurs applications (D'après www.leem.org) .....	37
Figure 6 : Méthodes de délivrance directs de protéines dans des cellules (D'après Miersch and Sidhu, 2016).....	38
Figure 7 : Schéma représentant le couplage des complexes protéiques .....	40
Figure 8 : Transport intracellulaire des toxines protéiques (D'après Falnes and Sandvig, 2000) .....	42
Figure 9 : Structure d'un PEI ramifié .....	46
Figure 10 : Structure d'un PLL .....	46
Figure 11 : Structure d'un chitosane .....	47
Figure 12 : Structure d'une cyclodextrine .....	48
Figure 13 : Structure de dendrimère.....	49
Figure 14 : Exemple de copolymères à blocs (D'après Pitard, 2004) .....	50
Figure 15 : Structure d'un lipide cationique.....	51
Figure 16 : Exemple de composants pour la tête cationique (Koynova and Tenchov, 2010)..	51
Figure 17 : Exemple de composants de la partie hydrophobe (Koynova and Tenchov, 2010)	52
Figure 18 : Exemple de composants des bras espaceur (Koynova and Tenchov, 2010) .....	53
Figure 19 : Stabilité colloïdale (Pitard, 2002) .....	54
Figure 20 : Etude de la complexation avec le BET (Pitard, 2002).....	55
Figure 21 : Schéma représentant des sections transversales à travers des films vitrifiés de différents types de liposomes et de complexes ADN/liposomes (Templeton, 2002) .....	56

Figure 22 : Représentations schématiques de la phase lamellaire $L_{\alpha}$ et de la phase hexagonal inverse $H_{II}$ (Koltover et al., 1998).....	57
Figure 23: Voies d'entrée cellulaire et trafic intracellulaire du système de délivrance non-viraux (D'après Villate-Beitia et al., 2015).....	58
Figure 24 : Multiples entrée dans la cellule de mammifère (D'après Conner and Schmid, 2003).....	59
Figure 25 : Schéma représentant le mécanisme d'éponge à protons (Pack et al., 2005) .....	62
Figure 26 : Schéma du mécanisme de « flip-flop » (Liang and W. Lam, 2012) .....	64
Figure 27 : Schéma du mécanisme d'internalisation photochimique (Ohtsuki et al., 2015)...	66
Figure 28 : Différentes aminoglycosides pour la tête polaire des lipides cationiques. ....	69
Figure 29 : Différents vecteurs lipidiques dérivés d'aminoglycosides et colipides.....	71
Figure 30 : Schéma représentant la préparation des complexes lipides cationiques/anticorps .....	79
Figure 31 : Structure d'une matTek .....	80
Figure 32 : Protocole de délivrance intracellulaire de l'anticorps fluorescent .....	81
Figure 33 : Images représentant les étapes de congélation pour la cryo-TEM .....	82
Figure 34 : Structure du fluoronanogold.....	83
Figure 35 : Etapes de la microscopie corrélative .....	83
Figure 36 : Principe du FIB-SEM (Briggman and Bock, 2012).....	85
Figure 37 : Protocole de la délivrance intracellulaire de l'anticorps en présence d'inhibiteurs .....	86
Figure 38 : Schéma du protocole de siRNA Cav-1 .....	86
Figure 39 : Schéma de la formation de la bicouche supportée en ATR-FTIR.....	90
Figure 40 : Structures des lipides cationiques.....	97
Figure 41 : Structure du lipide cationique DOST .....	97
Figure 42 : Structures des lipides cationiques dérivés de DOST .....	98
Figure 43 : Structures des liposomes homogènes et hybrides .....	119
Figure 44 : Structures des lipides cationiques (CLP ou CLN) et des colipides (HLP ou HLN)..	137
Figure 45 : Structures des liposomes homogènes et hybrides. ....	138
Figure 46 : Structures des lipides cationiques pour la délivrance de protéines .....	170
Figure 47 : Délivrance de l'anticorps anti-cytokératine 8 FITC dans des cellules HeLa vivantes .....	171

Figure 48 : Images de MET en coloration négative de DOPRI et des complexes lipides/anti-K8. .....	174
Figure 49 : Images de cryo-MET de DOPRI et des complexes DOPRI/anti-K8. ....	175
Figure 50 : Cinétique de la délivrance des complexes DOPRI/anti-K8 par microscopie à fluorescence. ....	177
Figure 51 : Visualisation 3D de la distribution des anticorps anti-K8 dans la cellule par la tomographie automatisée FIB-SEM. ....	179
Figure 52 : Visualisation de filaments décors par l'anti-K8 par microscopie corrélative.....	181
Figure 53 : Complexes DOPRI/anti-K8 dans les cellules HeLa.....	183
Figure 54 : Influence de la concentration des inhibiteurs sur la viabilité cellulaire. ....	184
Figure 55 : Voies d'internalisation impliquées dans le marquage des filaments par l'anti-K8. .....	186
Figure 56 : Analyse ATR-FTIR représentant l'attachement de l'anticorps à la bicouche supportée DOPRI.....	188
Figure 57 : Double immunomarquage de la protéine CFTR et K8 sur les cellules HeLa exprimant le CFTR WT ou le CFTR delF508. ....	190
Figure 58 : Délivrance de l'anticorps anti-K8 via DOPRI sur des celules HeLa exprimant HeLa exprimant le CFTR WT ou le CFTR delF508. ....	191
Figure 59 : Effet des inhibiteurs sur l'internalisation des marqueurs des voies d'endocytoses. .....	231
Figure 60 : Analyse ATR-FTIR représentant l'attachement de l'anticorps à la bicouche supportée DOPRI.....	232
Figure 61 : Analyse ATR-FTIR représentant l'attachement de l'anticorps à la bicouche supportée DOPRI.....	233
Figure 62 : Analyse de l'extinction du gène Cav-1 par Western Blot.....	234



## **Table des tableaux**

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes méthodes physiques pour la délivrance de gènes .....	31
Tableau 2 : Caractéristiques des différents vecteurs viraux pour la thérapie génique .....	32





## **Liste des abréviations**

### **A**

---

ACL : Amaurose congénitale de Leber

ADA : Adénosine déaminase

ADN : Acide désoxyribonucléique

Anti-K8 : Anticorps primaire de souris anti-cytokératine 8

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATR-FTIR : Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared

AVV : Virus associés aux adénovirus

### **B**

---

BGTC : Bis-guanidinium-trencholesterol

BET : Bromure d'éthidium

BIV : Vésicules bilamellaires

BSA : Bovine serum albumine

### **C**

---

Cav-1: Cavéoline-1

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CLN: Cationic lipid amide

CLP: cationic lipid phosphoramidate

CME: Clathrin-dependent pathway

CP: Virus *Sesbania mosaic*

CPP: Cell-penetrating peptide

Cryo-TEM: Cryogenic transmission electron microscopy

CvME: Caveolae-dependent pathway

## D

---

DNase I: Désoxyribonucléase I

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DMST: Dioleoyl-myristyl-succinyl-tobramycin

DOAT: Dioleoyl-adipyl-tobramycin

DODAPL: 2,6-diamino-hexanoic acid {5-amino-5-[5-[2-amino-6-(2,6-diamino hexanoylamino)-hexanoylamino]-1-(3-dioctadecylamino-propylcarbamoyl) pentylcarbamoyl]-pentyl}-amide

DODT: Dioleoyl-dithioglycolyl-tobramycin

DOPC: 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DOPE: Dioleoyl phosphatidylethanolamine

DOPRI: Dioleoyl-phosphatidyl-ribostamycin

DOPS: 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-L-serine

DOTAP: N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate

DOTMA: (+)-N,N,N-trimethyl-2,3-bis(zoctadec-9-enyloxy)-1-propanaminium chloride

DOSN: Dioleoyl-succinyl-neomycin

DOSP: Dioleoyl-succinyl-paromomycin

DOSRI: Diolelyl-succinyl-ribostamycin

DOST: Diolelyl-succinyl-tobramycin

DOSET: Diolelyl-sebacyl-tobramycin

DOSUT: Diolelyl-suberyl-tobramycin

DOSST: Diolelyl-succinyl-serinyl-tobramycin

DPST: Diolelyl-palmityl-succinyl-tobramycin

DSST: Diolelyl-stearyl-succinyl-tobramycin

## **E**

---

ESM : Erreur Standard Moyenne

## **F**

---

FIB-SEM: Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy

FITC: Fluorescéine ou fluorescein isothiocyanate

FNG-A594-Au: Fluoronanogold AlexaFluor594 Or colloïdal

## **H**

---

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HLN: Helper Lipid amide

HLP: Helper Lipid phosphoramide

HSV-1 : Virus de l'Herpès simplex 1

## **I**

---

ICP: Internalization photochimique

IGF-1: Insulin Growth Factor-1

IgG : Immunoglobuline

## **K**

---

K8 : Cytokératine 8

KanaChol: Kanamycine Cholestérol

## **L**

---

LDL: Lipoprotein Low density

## **M**

---

MEQ: iodure de 6-méthoxy-N-éthylquinolinium

MET : Microscopie électronique à transmission

MF : Microscopie à fluorescence

MM27: imiadazole-based helper lipid

MLV : Vésicules multilamellaires

## **N**

---

NLS : Nuclear Localization Signal

## **O**

---

Opti-MEM: Minimum Eagle's medium

## **P**

---

PAMAM: Polyamidoamine

PBS : Phosphate Buffer Saline

PEI : Polyéthylénimine

PEO : Polyéthylène Glycol

PKC : Protein Kinase C

PLL : Poly-L-Lysine

PPO : Polyphenylène oxide

PTD : Peptide Transduction Domains

PVDF : Polyfluorure de vinylidène

## **R**

---

RACKs: Receptor for activated C kinase

RISC: RNA-induced silencing complex

ROS: Reactive Oxygen Species

RRM2: Ribonucléotide réductase

## **S**

---

SAINT-2: N-methyl-4(dioleyl)methylpyridiniumchloride

SAP: Sperm Activated Peptide

SAXS : Diffraction des rayons X à petits angles

SCID : Défaut d'immunodéficience combiné sévère

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

siRNA : Acide ribonucléique interférent

SOD-1 : Superoxydase disulfatase 1

SpA : *Staphylococcus aureus*

SUV : Petites vésicules unilamellaires

**T**

---

TAT : Transactivator of transcription

TBS : Tris Buffered Saline

TEM : Transmission Electron Microscopy

TFA : Acide Trifluoroacétique

**V**

---

VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine 1

VLP : Particules de types virus







## Avant-propos

Le succès de la thérapie génique et protéique repose sur l'élaboration de vecteurs pour le transfert de macromolécules. Les **deux premiers chapitres** de ce manuscrit sont consacrés à une revue bibliographique non exhaustive de la thérapie génique et de la thérapie protéique. A ce jour, de nombreux vecteurs synthétiques pour la plupart lipidiques ou polymériques ont été synthétisés et évalués *in vitro* et *in vivo*. La mise au point de ces vecteurs synthétiques et l'étude de leurs propriétés physicochimiques constituent un axe de recherche essentiel. Leurs propriétés seront détaillées dans le **chapitre 3 des généralités**.

Suite aux récentes découvertes sur la délivrance de macromolécules notamment par des lipides cationiques qui fait état d'une forte efficacité de transfection, les dérivés lipidiques d'aminoglycosides (**chapitre 4 des généralités**) semblent être de bon candidat comme système de transport.

L'objectif de mon travail de thèse a été le développement et la caractérisation de nouveaux vecteurs synthétiques pour la délivrance de différentes macromolécules dans le cadre de plusieurs projets de recherche. L'étude des relations entre leurs propriétés physicochimiques et leur activité biologique s'est axée sur trois points.

Une partie de mon travail a été de caractériser différents systèmes lipidiques dérivés d'aminoglycosides en présence d'acides nucléiques en cryo-microscopie électronique. Ces résultats présentés dans **le chapitre 1 des résultats** ont été corrélés avec les résultats de l'activité biologique de ces composés. Ces travaux se sont concentrés sur la compréhension de l'importance des bras espaceur de manière de plus en plus fine.

La compréhension très fine de la relation entre la nature du bras espaceur et l'efficacité de transfection nous a conduit à transposer ce système de lipoaminoglycoside double (lipide + colipide) pour la délivrance d'un autre type de macromolécules : les protéines. Les résultats présentés dans le **chapitre 2 des résultats** caractérisent le système de délivrance protéique. Différentes protéines ont été délivrées par ce système notamment une protéine thérapeutique, la kératine 8, prometteuse dans l'approche de la mucoviscidose.

La majeure partie de mon travail a été de développer un nouveau système lipidique plus simple (sans colipide) et de l'utiliser pour la délivrance d'une protéine thérapeutique, la kératine 8. Dans ce travail, l'étude du mécanisme d'action de ce système lipidique dérivé d'aminoglycoside a été également étudiée et les résultats sont présentés dans **le chapitre 3 des résultats**. En effet, à ce jour, la compréhension du mécanisme d'internalisation et de délivrance des dérivés d'aminoglycosides lipidiques pour les protéines restent inconnus. Ces vecteurs synthétiques peuvent être appliqués pour la délivrance de protéines thérapeutiques. Il est devenu un enjeu majeur de santé publique de délivrer des protéines ou d'anticorps notamment pour le cancer ou encore pour certaines maladies comme la mucoviscidose.

# **Généralités**



## Généralités

### Chapitre 1 : Délivrance intracellulaire d'acides nucléiques

#### A. Thérapie génique

Née au milieu des années 80, la thérapie génique est basée sur le transfert de gènes à des fins thérapeutiques. Cette technique consiste à introduire dans des cellules hôtes du matériel génétique. Le gène est introduit soit directement sous forme d'ADN nu (méthodes physiques), soit grâce à un vecteur (viral ou synthétique). La délivrance intracellulaire de matériels génétiques dans des cellules spécifiques peut générer un effet thérapeutique en corrigeant une anomalie ou en fournissant aux cellules une nouvelle fonction (Stone, 2010). Le premier transfert de gène humain a été utilisé en 1989 sur des lymphocytes infiltrant les tumeurs. La première thérapie génique a été réalisée sur le gène ADA pour le traitement des patients atteints d'un déficit immunitaire (SCID) en 1990 (Blaese et al., 1995; Rosenberg et al., 1990). La thérapie génique s'est concentrée au début sur des maladies génétiques héréditaires, et maintenant sur diverses maladies (cancers, mucoviscidose, maladies inflammatoires, neurodégénératives...). A ce jour, plus de 1700 essais cliniques ont été répertoriés à travers le monde, en majorité dans le domaine de la cancérologie (plus de 60% de la totalité des essais), mais également dans les maladies cardiovasculaires (8% des essais) (Figure 1).

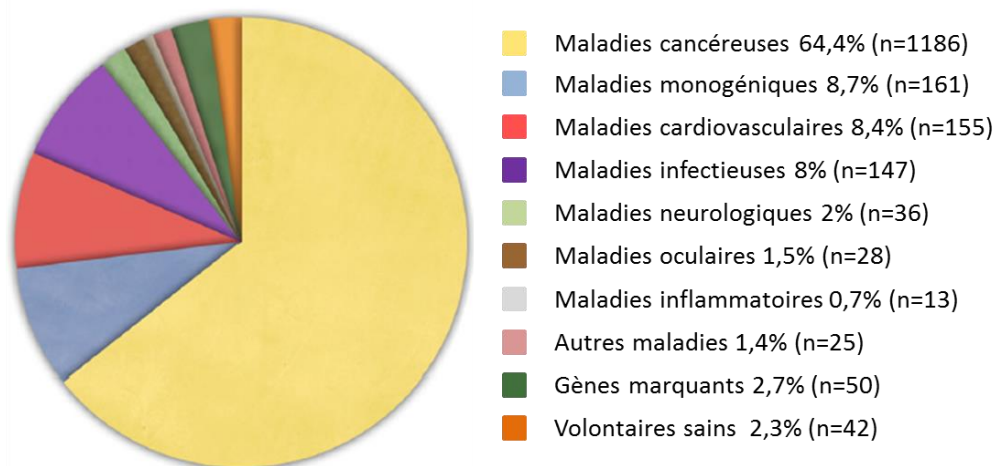


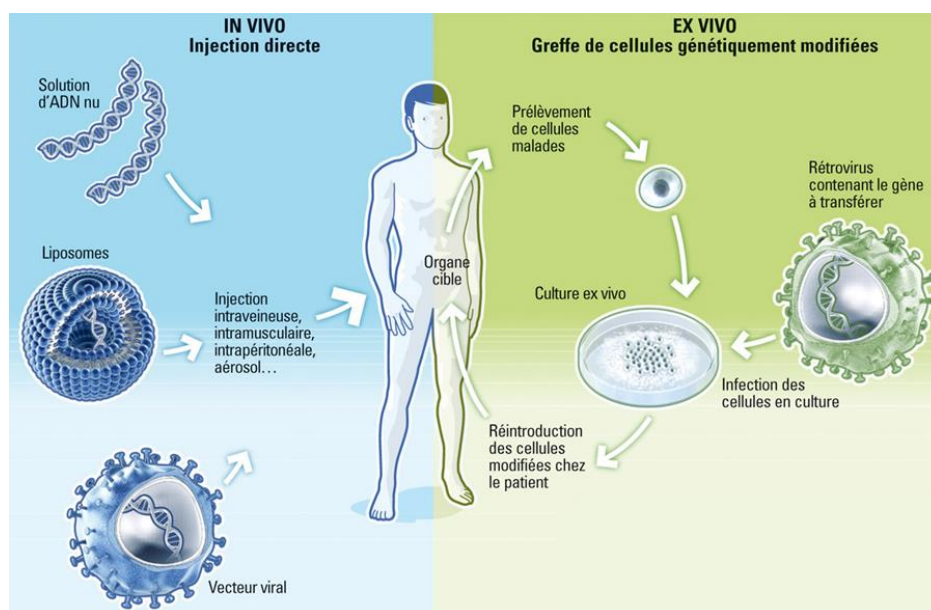
Figure 1 : Types de maladies pour les essais cliniques de thérapie génique (D'après Ginn et al., 2013)

Le succès de la thérapie génique dépend du choix d'un vecteur de transfection approprié. Ce vecteur doit être capable de: (i) protéger les acides nucléiques contre la dégradation par le sang et les nucléases, (ii) favoriser l'internalisation du matériel génétique dans les cellules cibles et (iii) libérer les acides nucléiques une fois à l'intérieur des cellules (Pezzoli et al., 2012). Donc, la difficulté majeure dans le transfert de gènes est d'obtenir une efficacité de transfection satisfaisante. Ce problème est devenu une limite aux développements importants d'essais cliniques. En effet, l'une des principales raisons pour lesquelles les essais cliniques de thérapie génique sont encore peu nombreux est le manque de moyen approprié et sûr pour délivrer le matériel génétique aux cellules cibles.

Un système idéal de délivrance de gènes devrait être efficace, spécifique, durable, sûr, facile à utiliser et aussi peu coûteux (Rodriguez et al., 2013). Différents types de systèmes de délivrance peuvent être appliqués en thérapie génique pour activer ou inhiber un gène spécifique (Nayerossadat et al., 2012).

## B. Systèmes de délivrance

L'efficacité de la thérapie génique dépend du fait que le matériel génétique doit être délivré à travers la membrane cellulaire et aller dans le noyau de la cellule où le gène sera inséré. Il existe deux grands types de thérapie génique (Figure 2):



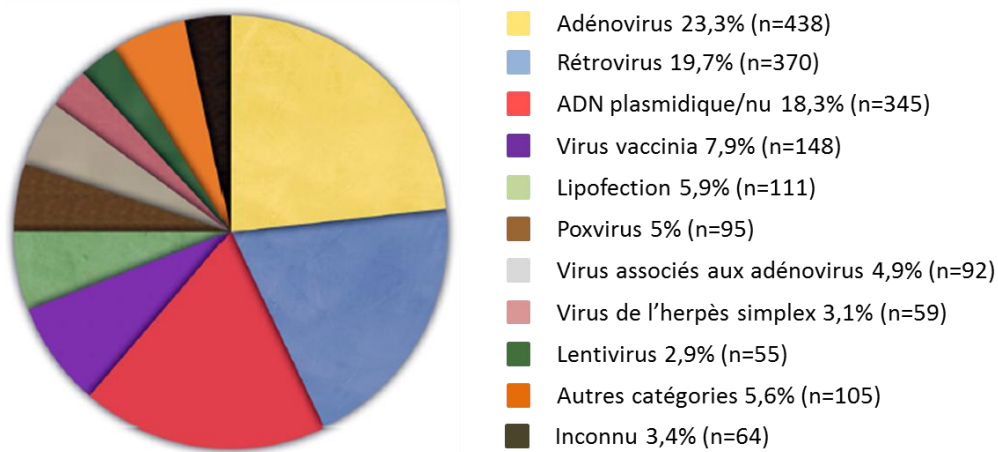
**Figure 2 : Voies de la thérapie génique**

Ils existent deux méthodes : soit injecter le matériel génétique (*in vivo*) soit le multiplier en laboratoire dans des cellules mutées (*ex vivo*) ([www.cnrs.fr](http://www.cnrs.fr))

- La thérapie génique *in vivo* consiste à injecter l'ADN nu ou le vecteur portant le gène thérapeutique directement dans la circulation sanguine ou le tissu cible. Le vecteur doit atteindre les cellules cibles. Ce système permet le transfert de matériel génétique via un vecteur approprié. Cette technique est utilisée, notamment, dans les cas de la mucoviscidose (transfert de vecteurs dans la trachée et les bronches), des cancers (injection dans la tumeur d'un vecteur portant le gène), ou de la dystrophie musculaire (injection dans le muscle d'un vecteur porteur du gène de la dystrophine).
- La thérapie génique *ex vivo* consiste à prélever sur le patient les cellules cibles, à les modifier génétiquement avec le vecteur viral porteur du gène thérapeutique puis à les réintroduire chez le patient. Cette approche comporte d'abord une étape de prélèvement de cellules chez l'individu à traiter. Ces cellules seront mises en culture, et le transfert de gènes sur les cellules en culture sera effectué. Les cellules modifiées par le transfert de gènes pourront alors être réimplantées chez l'individu. Cette approche de thérapie génique *ex vivo* est développée notamment pour le transfert de gènes dans des cellules souches adultes. Ces cellules souches seront modifiées par le transfert de gènes, puis réimplantées dans l'individu. Puisque les cellules souches ont des capacités d'auto-renouvellement, cette approche permet d'effectuer un transfert de gènes uniques et stables. Les cellules matures formées par la différenciation de ces cellules souches porteront la modification génétique introduite, permettant la correction du défaut génétique. Cette approche a été utilisée avec succès dans certains essais cliniques, notamment dans le cadre de différentes maladies génétiques touchant les constituants du sang (certains déficits immunitaires, hémoglobinopathies).

Toutes les approches de thérapie génique sont basées sur la notion de transfert de gènes. Le gène doit être véhiculé jusqu'à la cellule cible par des méthodes physiques ou par un vecteur. La méthode utilisée doit être sûre et efficace afin de promouvoir l'interaction spécifique avec la cellule cible (ciblage cellulaire), la pénétration intra-cytoplasmique et le transport du gène jusqu'au noyau. Différents systèmes ont été décrits pour le transfert de

gènes (Nayerossadat et al., 2012) (Figure 3). Les vecteurs viraux et les méthodes d'administrations physiques restent fortement utilisés dans les essais cliniques (plus de 80% des essais cliniques). Ce sont majoritairement les vecteurs viraux qui sont utilisés puisqu'ils ont une très bonne efficace de transfert de gènes. Il représente environ 65% des essais cliniques de thérapie génique.



**Figure 3 : Types de vecteurs utilisés pour les essais cliniques de thérapie génique (D'après Ginn et al., 2013)**

### 1. Méthodes physiques

Dans le but d'administrer des gènes, des méthodes physiques sont utilisées pour créer des trous afin que le gène traverse la membrane cellulaire (Al-Dosari and Gao, 2009; Davis, 2002; Rodriguez et al., 2013). Les méthodes physiques appliqués pour la délivrance de gènes sont basés sur la pénétration transitoire à travers la membrane cellulaire par énergie mécanique (Audouy et al., 2002), magnétique (Kim et al., 1996); (Plank et al., 2003), électrique (Wolff et al., 1992), ultrasonique (Maruyama et al., 2004), hydrodynamique ou laser (Klein et al., 1992); (Lurquin, 1997). L'entrée de l'ADN dans la cellule cible est donc facilité (Kamimura et al., 2011). Ces différentes techniques sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 1).



METHODES PHYSIQUES	DESCRIPTION	AVANTAGES	INCONVENIENTS
<b>MICRO-INJECTION</b>	Injection des plasmides dans le noyau d'une cellule avec une micropipette	Forte efficacité de transfection (quasiment 100%)	Faible nombre des cellules traitées
<b>INJECTION DIRECTE</b>	Injection directe de plasmide dans tissu	Sûre, simple	Dégradation rapide, faible efficacité de transfection
<b>INJECTION HYDRODYNAMIQUE</b>	Injection d'une solution plasmidique dans la veine de la queue d'un rongeur	Transfection efficace essentiellement dans le foie	Inefficace chez l'humain
<b>SONOPORATION</b>	Utilisation d'ultrasons de faible ou forte intensité en présence de microbulles	Faible intégration dans le génome, non immunogène, administration répétée possible	Taille et concentration de l'ADN plasmidique limitées
<b>LASER/CHAMPS MAGNETIQUES</b>	Laser désorganise la membrane plasmique, transfection d'ADN couplé à des nanoparticules magnétiques	Simple, faible toxicité, efficaces dans les lignées cellulaires	Faible efficacité dans les cellules primaires
<b>CANON A ADN</b>	Bombardement d'un tissu ou cellules cibles avec des billes d'or recouvertes d'ADN	Quantité d'ADN faible	Limitation aux tissus superficiels
<b>ELECTROTRANSFERT</b>	Emissions de chocs électriques pour désorganiser membrane plasmique	Augmentation de l'expression du transgène	Intégration dans seulement 0,01% des cellules traitées, procédure difficile

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes méthodes physiques pour la délivrance de gènes

### Bilan des méthodes physiques :

Le choix de l'une de ces méthodes physiques dépend essentiellement de l'application thérapeutique envisagée. Ces méthodes assurent le transfert de l'ADN directement dans le cytoplasme, mais l'efficacité de transfection demeure dépendante de sa capacité à atteindre et pénétrer le noyau. Les inconvénients majeurs de ces techniques restent leur nature invasive et la difficulté à atteindre des tissus profonds. Par conséquent, de nouvelles techniques basées sur la vectorisation des gènes se sont développées afin de transférer des gènes dans des cellules.

## 2. Vecteurs viraux

Les vecteurs viraux utilisent les capacités naturelles des virus à pénétrer dans les cellules hôtes (Huang et al., 2011). Ils délivrent leurs matériels aux cellules et exploitent la

machinerie cellulaire pour faciliter leur réplication (Thomas et al., 2003). Le principal avantage des vecteurs viraux est l'efficacité du transfert de gènes élevée. Les virus représentent donc une excellente catégorie pour le développement de vecteurs recombinants afin d'administrer des gènes (Pezzoli et al., 2012). Cependant, les vecteurs viraux ont des obstacles tels que la faible capacité de charge, la production coûteuse et complexe, leur forte immunogénicité, et plus important encore, la mutagenèse par insertion, car ils peuvent induire l'oncogénèse lors de l'intégration aléatoire dans le génome de l'hôte (Gardlík et al., 2005). Le système immunitaire humain reconnaît et combat les virus, diminuant leur efficacité (Pezzoli et al., 2012).

Les vecteurs viraux peuvent être classés en 2 groupes : ceux qui intègrent leur patrimoine génétique dans l'ADN de l'hôte (rétrovirus et lentivirus) et ceux qui ne l'intègrent pas (adénovirus, virus associés aux adénovirus et virus de l'herpès). Les différentes caractéristiques de ces vecteurs sont résumées dans le Tableau 2.

VECTEURS VIRAUX	DESCRIPTION	INTEGRATION GENOME	TAILLE INSERT	AVANTAGES	INCONVENIENTS
<b>RETROVIRUS</b>	Petit viral à ARN simple brin, transcrit en ADN dans le cytoplasme	Oui	10 kb	Expression stable à long terme	Incapacité à transduire dans les cellules quiescentes et en division
<b>LENTIVIRUS</b>	Rétrovirus dérivé du virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	Oui	10 kb	Efficacité de transfection dans cellules quiescentes et en division, expression stable à long terme	Imprévisibilité du site d'intégration, difficulté de production
<b>ADENOVIRUS</b>	Virus d'ADN double brin	Non	10-30 kb	Forte efficacité de transfection dans les cellules en division et quiescentes	Forte réaction immunogène, expression transitoire
<b>VIRUS ASSOCIES AUX ADENOVIRUS (AVV)</b>	ADN simple brin, association aux adénovirus pour encapsidation	Conditionnelle	4-5 kb	Efficacité de transfection dans cellules quiescentes et en division, expression stable à long terme	Capacité limitée du transgène, difficulté de production, forte réponse humorale
<b>VIRUS DE L'HERPES SIMPLEX 1 (HSV-1)</b>	ADN double brin devenant circulaire dans le noyau	Non	30-40 kb	Efficacité de transfection dans cellules quiescentes et en division	Toxicité forte

Tableau 2 : Caractéristiques des différents vecteurs viraux pour la thérapie génique

De nombreux critères (type cellulaire, taille, du gène, stabilité du gène, toxicité du vecteur) rentrent en jeu pour le choix du vecteur viral le plus approprié pour la délivrance d'acides nucléiques. A ce jour, les plus fréquemment utilisés sont les vecteurs rétroviraux (37%), les vecteurs lentiviraux, les vecteurs adénoviraux (20%) et les vecteurs adénovirus associés (AVV).

#### **Bilan des vecteurs viraux :**

Malgré certains succès indéniables, les vecteurs viraux n'ont pas répondu à toutes les attentes et les inclure dans des applications cliniques n'est pas sans danger. La manipulation de particules virales est associée à un risque non négligeable de réactions immunitaires, et de transformation maligne des cellules transduites. Les recherches se heurtent aussi aux coûts et aux difficultés de manipulation de ces produits biologiques. Finalement, les caractéristiques des virus réduisent son champ d'application. Ainsi, parallèlement à la mise au point de nouveaux vecteurs viraux, les recherches se sont accentuées sur le développement de vecteurs synthétiques.

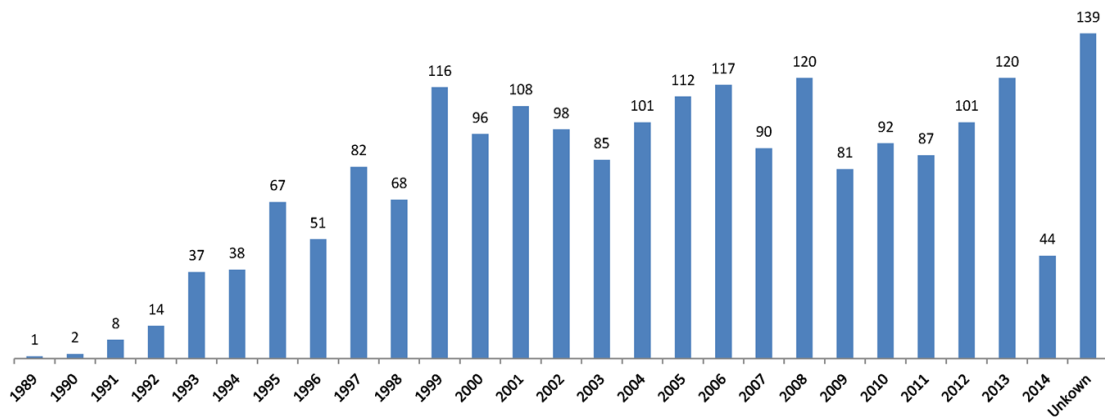
### 3. Vecteurs synthétiques

Les vecteurs synthétiques peuvent être des lipides cationiques ou des polymères cationiques. Ils forment des complexes condensés avec l'ADN chargé négativement par des interactions électrostatiques. Les complexes appelés lipoplexes ou polyplexes protègent l'ADN et facilitent l'internalisation intracellulaire habituellement par endocytose (Al-Dosari and Gao, 2009). Ces systèmes synthétiques de délivrance ont plusieurs avantages. Les vecteurs synthétiques peuvent être produits à grande échelle avec une reproductibilité élevée et des coûts acceptables. Ils sont relativement stables au stockage. Ils peuvent être administrés à plusieurs reprises avec peu ou pas de réponse immunitaire et la dimension du matériel génétique qu'ils peuvent transporter semble illimité (Davis, 2002; Rodriguez et al., 2013). Les caractéristiques et le mécanisme d'action de ces vecteurs seront détaillés dans le chapitre 3 : Vecteurs synthétiques.

## C. Essais cliniques

De nombreux systèmes de vecteurs viraux et synthétiques ont été développés ces 3 dernières décennies. Il n'existe pas encore un système de délivrance qui peut être appliqué à la thérapie génique pour tous les types cellulaires *in vitro* et *in vivo*. Quelques systèmes de délivrance sont efficaces pour la délivrance de gènes dans des cellules ou tissus spécifiques. Il semble donc que le processus de développement de système de délivrance efficace, en particulier les systèmes synthétiques, pour une utilisation *in vivo* est encore à améliorer. Plusieurs mesures sont envisageables notamment (i) l'amélioration du ciblage extracellulaire (ii) l'amélioration de la délivrance intracellulaire et de l'expression à long terme de protéines (iii) la réduction de la toxicité et de l'effet sur le corps humain.

Toutefois, de 2009 à 2011, des réussites d'essais cliniques nous ont donné beaucoup d'espoirs pour la thérapie génique (traitement de maladie congénitale de la rétine, maladie de Parkinson...). Par exemple, en 2010, une étude (Simonelli et al., 2010) s'est intéressée à l'innocuité et l'efficacité de la thérapie génique pour les maladies héréditaires de la rétine. Cela était testé chez les humains atteints d'amaurose congénitale de Leber (ACL), une maladie autosomique récessive (due aux mutations dans le gène RPE65). Trois études indépendantes ont démontré que l'administration sous-rétinienne de vecteurs viraux associés aux adénovirus (AVV) codant pour RPE65, chez des patients atteints d'ACL, est sûre et efficace. La persistance de l'amélioration fonctionnelle suggère que le transfert de gènes médiés par AVV dans la rétine humaine ne provoque pas de réponse immunologique. La sécurité de l'intervention et l'amélioration de la fonction visuelle et rétinienne dans ces sujets soutiennent l'utilisation d'une thérapie génétique par les AVV. Depuis de nombreuses études cliniques ont été menées et cela ne cesse d'augmenter. En effet, depuis le début du premier essai clinique de thérapie génique en 1989, plus de 2000 nouveaux essais cliniques de thérapie génique ont été approuvés dans le monde entier (Figure 4).



**Figure 4 : Nombres d'essais cliniques de thérapie génique dans le monde entre 1989 et 2014 (D'après Villate-Beitia et al., 2015).**

En dépit de la prédominance des vecteurs viraux dans les essais cliniques pour la délivrance de gènes (due à leur plus grande efficacité de transfection), les vecteurs synthétiques représentent une alternative prometteuse et plus sûre que les virus. Les systèmes synthétiques de délivrance de gènes sont actuellement à l'étude. Il est raisonnable de penser qu'il est important de continuer à développer les systèmes synthétiques afin d'avoir un système de délivrance pour la thérapie génique sûr, facile à produire et peu coûteux.

## **Chapitre 2 : Délivrance intracellulaire de protéines**

### **A. Thérapie protéique**

La délivrance de protéines thérapeutiques ou thérapie protéique est une méthode similaire mais complémentaire à la thérapie génique. La délivrance de protéines ne requiert pas d'activer les processus de machinerie cellulaire, la protéine thérapeutique est directement délivrée active et fonctionnelle. La thérapie protéique est utilisée pour cibler des macromolécules intracellulaires. Le remplacement de protéines dysfonctionnelles est une méthode sûre et directe pour le traitement de maladies. Cette méthode n'engendre pas de modifications génétiques aléatoires et permanentes. De plus, l'action de la protéine thérapeutique est hautement spécifique. Avec cette méthode, la possibilité d'interférer avec les processus biologiques (ayant des effets délétères) est quasi nulle.

Par exemple, la délivrance d'anticorps directement dans des cellules vivantes aurait la capacité d'inhiber ou d'activer d'autres fonctions intracellulaires spécifiquement. On pourrait également restaurer la fonction intracellulaire de protéines contrôlant la signalisation intracellulaire, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, l'oncogenèse et la régulation de la transcription. La délivrance des protéines ou peptides recombinants sera un énorme avantage pour tous les aspects de la biologie cellulaire et génomique fonctionnelle. Cette méthode permettrait d'augmenter l'expression d'une protéine déjà existante, de fournir une nouvelle fonction, d'interférer avec une molécule, ou encore de délivrer d'autres protéines.

La thérapie protéique est un traitement médical qui offrirait beaucoup de promesse. La connaissance sur la thérapie protéique reste encore aujourd'hui très expérimentale, mais les scientifiques gardent espoir au vue des nombreuses études à ce jour. Même si encore de nombreuses études sont menées sur les animaux, les essais sur l'homme faits en thérapie protéique ont montré des résultats prometteurs dans certains domaines. Plus de 100 protéines thérapeutiques modifiées (Dingermann, 2008) sont approuvées pour une utilisation clinique dans l'Union européenne et aux États-Unis. Les anticorps monoclonaux en représentent une grande majorité (22%) (Figure 5).

La plupart des protéines thérapeutiques actuellement sur le marché sont recombinantes et des centaines d'entre elles sont utilisées dans les essais cliniques pour la thérapie des

cancers (17%), des troubles immunitaires, des infections (30%) et d'autres maladies (Figure 5).

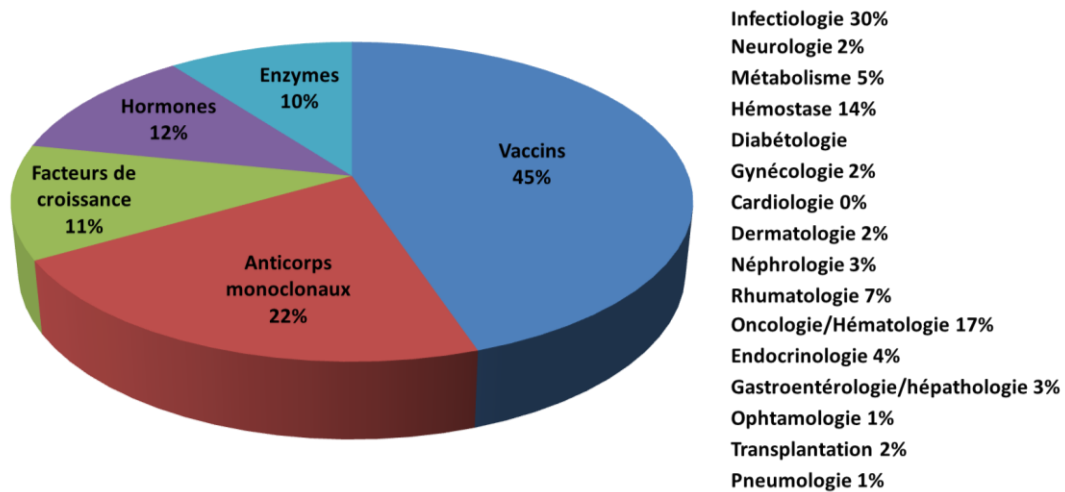


Figure 5 : Marché des protéines recombinantes et leurs applications (D'après [www.leem.org](http://www.leem.org))

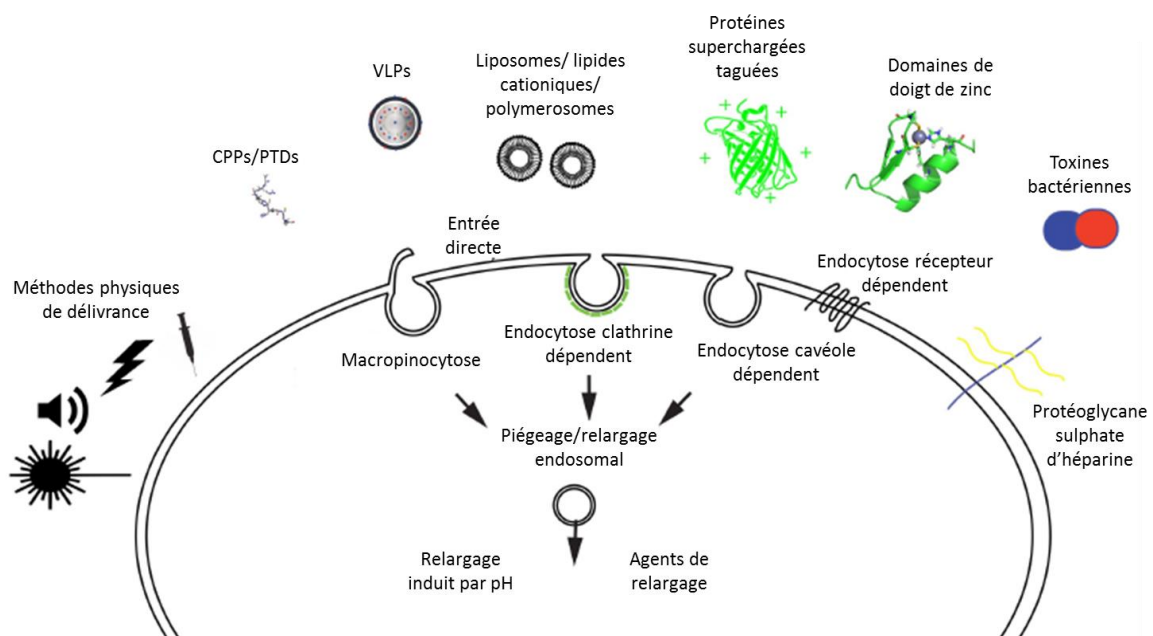
Ces protéines thérapeutiques peuvent être (i) des anticorps monoclonaux comme le Rituximab ou le Trastuzumab (Bange et al., 2001; Maloney, 2012) destinés au traitement de maladies auto-immunes ; (ii) des hormones telles que l'érythropoïétine ou IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) qui permet le traitement des anémies hypoplasiques ou le retard de croissance (Eschbach et al., 1987; Fintini et al., 2009); (iii) des enzymes comme la DNase I ou la glucocérébrosidase permettant de pallier aux déficits génétiques (Aviezer et al., 2009; Fuchs et al., 1994).

Cependant, le plus grand défi à l'utilisation de protéines thérapeutiques concerne le moyen utilisé pour atteindre sa cible intracellulaire. En effet, les propriétés physico-chimiques des protéines telles que leur charge, leur hydrophobicité ne leur permettent pas de traverser spontanément les membranes hydrophobes. Afin de franchir les membranes plasmiques, les systèmes de délivrance utilisés pour les acides nucléiques sembleraient une solution et offriraient une opportunité pour délivrer des protéines.

## B. Méthodes de délivrance

Les propriétés requises des systèmes de transport utilisés pour la délivrance intracellulaire de protéines sont imposés par différents paramètres tels que les propriétés biologiques des protéines délivrées, la composition du tampon, le type cellulaire ou encore le temps d'incubation.

Divers systèmes de transport ont été décrits pour délivrer des protéines fonctionnelles à l'intérieur de la cellule (Figure 6). Les différents mécanismes potentiels d'internalisation sont soit de manière directe soit par endocytose. Ces mécanismes conduisent tous à un piégeage dans les endosomes puis à relargage induit par le pH ou un agent chimique. Parmi les systèmes de délivrance, on retrouve les méthodes physiques mais également des vecteurs synthétiques tels que les lipides cationiques. Une autre des stratégies pour délivrer des protéines au niveau intracellulaire est de fusionner la protéine avec des complexes protéiques (peptide de pénétration cellulaire, toxines...).



**Figure 6 : Méthodes de délivrance directs de protéines dans des cellules (D'après Miersch and Sidhu, 2016)**

Diverses méthodes ont été décrites pour délivrer des protéines fonctionnelles à l'intérieur de la cellule et sont illustrées avec des mécanismes potentiels d'internalisation et de libération endosomale. CPP, peptide de pénétration cellulaire; PTD, Domaine de transduction protéique; VLP, particule de type virus. Les différentes méthodes de délivrance permettent soit une entrée directe soit une endocytose. Elles conduisent toutes à un piégeage dans les endosomes puis à relargage induit par le pH ou un agent.



## 1. Méthodes physiques

Des méthodes physiques similaires à celles utilisées pour la délivrance d'acides nucléiques ont été explorées. L'électroporation (Sharei et al., 2013) et la microinjection (Adamo et al., 2013) ont été utilisées pour introduire des protéines fonctionnelles dans des cellules.

Dans l'électroporation, les cellules sont exposées à un champ électrique qui forme des pores dans la membrane cellulaire permettant la diffusion des protéines dans le cytoplasme. Cette technique évite le piégeage dans les endosomes. Cependant, des inconvénients tels que le nombre faible de cellules transfectées, la toxicité cellulaire ou l'agrégation de protéines sont un réel problème.

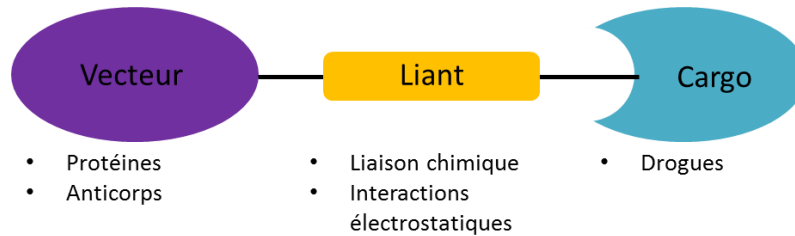
La microinjection est un processus dans lequel le composé d'intérêt est délivré par injection intracellulaire avec une aiguille. Cette technique est la manière la plus directe de délivrer des molécules.

De manière générale, la délivrance de protéines par électroporation est encore peu utilisée comparé à la microinjection. Par exemple, la microinjection a été utilisée afin d'injecter des anticorps bloquant dirigés contre le proto-oncogène c-cos dans des fibroblastes de rat (Riabowol et al., 1988). Cette étude a permis de souligner l'implication du proto-oncogène dans la régulation temporelle du cycle. Cette technique peut être également utilisée pour étudier le mécanisme d'action de protéines présentes naturellement au niveau cellulaire. Par exemple, la délivrance de protéines RACKs par microinjection a permis d'observer son effet sur la translocation et sur l'activité de la protéine kinase C (PKC) (Smith and Mochly-Rosen, 1992). La micro-injection d'un excès de RACKs exogènes a inhibé la translocation de la PKC induite par l'insuline et a retardé la maturation des ovocytes. La translocation de la PKC résulterait de la liaison de la PKC aux particules RACKs et que cette liaison est nécessaire pour les fonctions cellulaires médiées par PKC.

Cependant, il existe des méthodes alternatives utilisant des modifications chimiques ou une formulation synthétique afin de délivrer des protéines actives et fonctionnelles.

## 2. Internalisation de complexes protéiques

Certaines protéines d'origines végétales, animales, bactériennes ou virales ont la capacité de traverser spontanément les barrières biologiques. Les propriétés de ces protéines ont été utilisées afin de créer des protéines d'intérêts modifiées ayant la capacité à être internaliser. La protéine « vecteur » est liée à la protéine à délivrer (cargos) par des liaisons chimiques ou par des interactions électrostatiques (Figure 7).



**Figure 7 : Schéma représentant le couplage des complexes protéiques**

La protéine ou peptide « vecteur » est liée à un cargo par des liaisons chimiques ou des interactions électrostatiques.

### a. Domaines de transduction protéiques

Les peptides de pénétration cellulaire (CPPs) ou les domaines de transduction protéiques (PTDs), originellement dérivés des virus, sont des courtes séquences d'acides aminés (10-30 résidus) qui sont cationiques et/ou amphiphatiques (Liang and W. Lam, 2012). Ils ont la capacité de pénétrer la membrane cellulaire à faible concentrations moléculaires sans causer de dommages significatifs à la membrane. Les CPPs forment des complexes avec des protéines ou peptides, par interactions électrostatiques, ou peuvent être incorporés dans des polymères ou des lipides (Liang and W. Lam, 2012). Ces complexes peuvent être internalisés avec une haute efficacité et une faible toxicité (Madani et al., 2011). De nombreuses études utilisant des CPPs démontrent la faisabilité et l'efficacité de l'utilisation de protéines modifiées avec les CPPs comme agents thérapeutiques. Les CPPs peuvent réduire la dose nécessaire pour atteindre le niveau thérapeutique et peuvent être utilisés pour faciliter la délivrance dans des cellules spécialisées. Les CPPs peuvent être classés en deux catégories (Patel et al., 2007): (i) des peptides cationiques qui contiennent habituellement des résidus d'arginine et de lysine et (ii) des peptides amphiphatiques qui sont à la fois des segments hydrophobes et hydrophiles. Les deux exemples de CPPs actuellement utilisés pour améliorer l'efficacité de la transfection des cellules non virales

sont le peptide TAT et le peptide SAP. Le peptide TAT est le premier CPP identifié. Il est dérivé du facteur activant la transcription de virus immunodéficient humain (VIH-1) (Fawell et al., 1994) ; (Brooks et al., 2005; Varkouhi et al., 2011). Quant au peptide SAP, il est un peptide d'origine synthétique, amphiphatique riche en proline (del Pozo-Rodríguez et al., 2009). Les résultats obtenus avec ces systèmes aussi bien *in vivo* que dans les essais cliniques sont encourageants et soulignent l'avancée dans la thérapie protéique.

#### b. Particules de types virus (VLPs)

Des particules de types virus (VLPs) sont des particules auto-assemblées composées de protéines virales. Leur capacité à encapsuler une variété de biomolécules (acides nucléiques et protéines) est intéressante pour le développement d'agents délivrant des protéines. En 2016, (Abraham et al., 2016) ont montré la possibilité d'utiliser des nanoparticules issues de virus de plantes pour la délivrance intracellulaire d'anticorps. Ils ont utilisé la protéine d'enveloppe du virus *Sesbania mosaic* (CP) et le domaine B de la protéine A de *Staphylococcus aureus* (SpA) pour générer une boucle B SeMV (*Sesbania mosaic virus*), qui s'auto-assemble en particules virales (VLPs). Ces particules peuvent être internalisées dans différents types de cellules mammifères et peuvent délivrer efficacement trois anticorps monoclonaux différents (anti- $\alpha$ -tubulin, anti-abrin, anti-HER2).

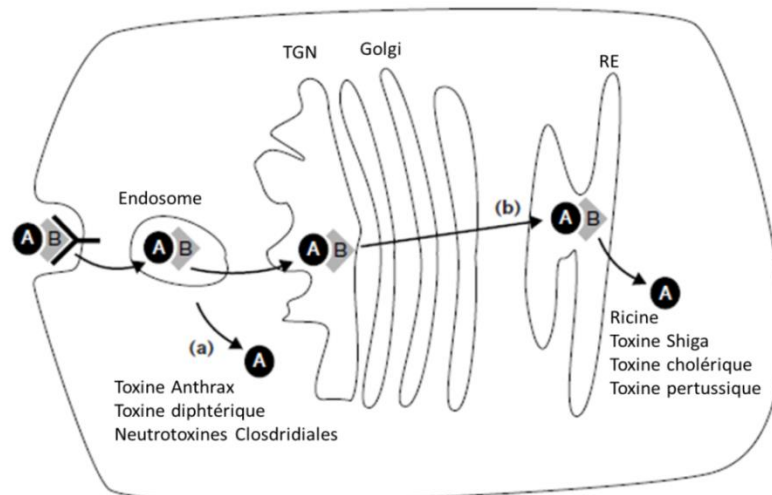
#### c. Immunotoxines

Les immunotoxines sont le couplage d'un anticorps avec une toxine. Elles reposent sur la capacité de certaines toxines protéiques à accéder au cytoplasme depuis le milieu extracellulaire. Ces toxines sont composées de deux domaines : un domaine de liaison B permettant l'attachement à la membrane et le transport de l'endosome vers le cytosol et un domaine catalytique A qui tue la cellule en bloquant une cible intracellulaire.

Deux stratégies de mode d'action intracellulaire sont utilisées par les toxines pour permettre l'introduction de leurs activités toxiques dans les cellules (Figure 8). Les toxines telles que la toxine anthrax ou diphtérique injectent sa sous-unité A à partir d'un compartiment endosomal (Figure 8a). En revanche, les toxines cholériques, pertussiques ou encore la ricine, après leur endocytose, sont transportées jusqu'au réticulum endoplasmique par une étape de transport rétrograde (Figure 8b).

Dans le cas de la toxine diphtérique, une fois endocytée, elle se retrouve dans les endosomes où elle est soumise à l'acidification et est partiellement dénaturée. La toxine est insérée dans la membrane où la chaîne B forme un canal qui facilite l'échappement endosomal du domaine A.

Dans le cas de la ricine, cette glycoprotéine issue de *R. communis* se lie à la surface des cellules de façon non spécifique grâce à la fonction lectine de son domaine B qui reconnaît des résidus galactoses puis est internalisée par endocytose. La toxine est dirigée vers l'appareil de Golgi par transport rétrograde des endosomes, puis vers le réticulum endoplasmique. La ricine est alors capable d'accéder au cytosol à l'aide d'un complexe de translocation de protéines. La fonction initiale de ce complexe est d'insérer dans le réticulum endoplasmique les protéines en cours de traduction ou d'en extraire les protéines mal conformées et de la diriger vers le protéasome (Sandvig and van Deurs, 2000). Une fois libérée dans le cytosol, le domaine A de la ricine provoque l'arrêt de la synthèse protéique et conduit à la mort cellulaire (Endo and Tsurugi, 1987).



**Figure 8 : Transport intracellulaire des toxines protéiques (D'après Falnes and Sandvig, 2000)**

La toxine se lie à un récepteur de surface cellulaire (forme Y) à travers son fragment B (gris). La fraction toxine A (noire) est, dans certains cas (a), transloquée dans le cytosol des endosomes, alors que dans d'autres cas (b), un transport rétrograde, jusqu'au RE, est nécessaire pour la translocation.

Les immunotoxines sont aujourd'hui approuvées en médecine humaine et particulièrement en cancérologie. Par exemple, la ricine, une protéine végétale cytotoxique isolée de graines de ricin, est une protéine inactivant les ribosomes qui détruit les cellules en inhibant la synthèse des protéines. La ricine présente un grand potentiel comme agent anti-cancéreux

et exerce son activité anti-cancéreuse en induisant l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Tyagi et al., 2015). Il a été montré que le couplage covalent de la sous-unité A de la ricine à un anticorps spécifique anti-IgG permet la lyse sélective de lymphocytes produisant des IgGs ciblées. Ceci offre la possibilité de traiter les lymphomes B (Krolick et al., 1980).

Ces immunotoxines ne sont pas seulement utilisés dans le domaine des cancers mais aussi pour la délivrance de protéine ciblée. La toxine tétanique, présentant une affinité pour les neurones, a été fusionnée avec la superoxydase-dismutase 1 (SOD-1) et injectée dans le liquide cébrospinal de souris. Cette étude a montré que la protéine est délivrée spécifiquement dans les neurones et conserve l'activité anti-oxydante de SOD-1 (Benn et al., 2005).

### 3. Vecteurs synthétiques

Bien qu'utile pour protéger les protéines, l'encapsulation peut être un challenge du fait de l'instabilité et la diversité structurale des protéines. L'encapsulation dans des vésicules lipidiques et polymériques sont des méthodes utilisées pour délivrer des protéines. Ces deux types sont décrits brièvement dans cette partie. Le chapitre suivant (Vecteurs synthétiques) approfondira ces systèmes de délivrance.

Les vecteurs lipidiques peuvent être des lipides cationiques sous forme de liposomes, de micelles. Récemment, des lipides cationiques ont été utilisés pour la délivrance intracellulaire de protéines fonctionnelles (Murthy et al., 1999; Tian et al., 2015). La formulation de lipides cationiques interagit rapidement et de façon non covalente avec la protéine créant un vecteur protecteur pour la délivrance immédiate dans les cellules. Par exemple, la formulation DODAPL:DOPE (lipide +colipide) délivre efficacement les protéines fonctionnelles ( $\beta$ -galactosidase, enzymes) dans des cellules vivantes (Zelphati et al., 2001). Dans une autre étude, un lipide cationique possédant un groupement de tête lysine a été utilisé pour délivrer une protéine fonctionnelle (anticorps anti-actine) dans des cellules humaines (Sarker et al., 2014). Ce système de transport avec les lipides permet de délivrer les protéines dans des cellules aussi sûrement, efficacement et facilement que pour l'ADN.

Les vecteurs à base de polymères cationiques sont pour la plupart des particules sphériques de taille 1-1000 nm. Il existe différents types de polymères cationiques, tels la polyéthylénimine (PEI), la poly(L-lysine) (PLL), les chitosans, les cyclodextrines, les

dendrimères cationiques ou encore les copolymères à blocs. Récemment, il a été démontré que les propriétés d'auto-assemblages des polyéthylémines modifiés avec un groupement pyridylthiourée ( $\pi$ PEI) interagissent avec les protéines et favorisent leur libération dans le cytosol de cellules mammifères (Postupalenko et al., 2014). En milieu aqueux à pH 7,4, l'auto-association de  $\pi$ PEI en présence de protéines conduit à des assemblages supramoléculaires protégés par des protéines et aident à l'administration/transfert dans le cytosol de cellules de mammifères via l'endocytose.

Les résultats obtenus avec ces systèmes de délivrance aussi bien *in vivo* que dans les essais cliniques sont encourageants et soulignent l'avancée dans la thérapie protéique. Le développement de méthodes pour la délivrance d'agents thérapeutiques de façon efficace et protégée vers les cellules cibles reste encore une question principale. Ces systèmes innovants de délivrance de protéines représentent un outil puissant et peuvent avoir un potentiel pour les applications thérapeutiques.

## **Chapitre 3 : Vecteurs synthétiques**

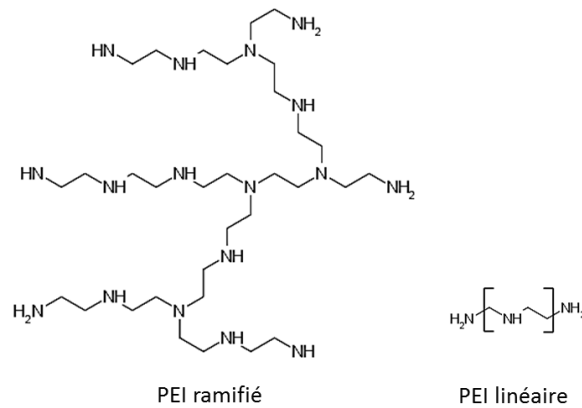
Actuellement, il existe une multitude de vecteurs synthétiques tels que les lipides cationiques (Zelphati et al., 2001), les nanoparticules polymériques (Akagi et al., 2011), les nanocapsules (Yan et al., 2010) et les peptides cationiques amphiphiles (Morris et al., 2001). La possibilité d'atteindre des cibles intracellulaires offrirait un vaste champ d'application dans le domaine thérapeutique. Les protéines ne peuvent pas traverser spontanément la membrane plasmique des cellules d'où l'intérêt de développer des systèmes adaptés. Dans ce chapitre, les vecteurs polymériques seront brièvement décrits. Les vecteurs lipidiques seront développés étant donné qu'ils sont le point central des études menées durant cette thèse. Enfin, les différents mécanismes d'action de ces vecteurs seront décrits.

### **A. Polymères**

Les polymères cationiques sont capables de condenser l'ADN empêchant sa dégradation (Abdelhady et al., 2003). L'ADN peut être piégé dans la matrice polymère ou peut être adsorbé ou conjugué sur la surface des nanoparticules (Braun, 2008). Les polymères cationiques, tels la polyéthylémine (PEI), la poly(L-lysine) (PLL), les chitosans, les cyclodextrines, les dendrimères cationiques ou encore les copolymères à blocs, s'associent à l'ADN par des interactions électrostatiques multiples, ce qui génère des particules appelées polyplexes (Bloomfield, 1997; Felgner et al., 1987).

#### **1. Polyéthylémine (PEI)**

Le polyéthylémine ou PEI est un polymère dense chargé positivement, synthétisé linéairement ou sous forme ramifiée (Figure 9). Les deux formes de PEI contiennent des amines secondaires et une amine primaire terminale mais seuls les PEI ramifiés possèdent en plus des amines tertiaires. Le PEI (polyéthylémine) permet la transfection d'acides nucléiques *in vitro* et *in vivo* (Billiet et al., 2012; Boussif et al., 1995; Demeneix and Behr, 2005).

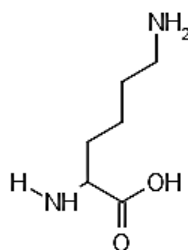


**Figure 9 : Structure d'un PEI ramifié**

La PEI est un vecteur doté d'un pouvoir endosomolytique (Behr, 1997; Fischer et al., 2003) grâce à son effet « éponge à protons ». Cette propriété lui permet de libérer le polyplexe dans le cytoplasme sans que l'ADN soit dégradé par les enzymes lysosomales et fait de lui un bon vecteur non viral pour le transfert de gènes. Les complexes PEI/ADN ont une forme sphérique, globulaire ou en bâtonnet (Dunlap et al., 1997).

## 2. Poly L-lysine (PLL)

Les poly-L-Lysines ou PLL sont des polypeptides linéaires dont la sous-unité est la lysine (Figure 10). Ce sont des polymères dégradables, ce qui les rend intéressant pour une utilisation *in vivo*. En présence d'ADN, les PLL peuvent former des complexes grâce à la présence de groupes amines protonables sur le fragment lysine (Braun, 2008).



**Figure 10 : Structure d'un PLL**

Ce polymère ne présente en revanche qu'un faible pouvoir tampon ne permettant pas une sortie efficace des endosomes. Les polyplexes formés avec la poly-L-Lysine requièrent donc des agents endosomolytiques (chloroquine) ou fusogéniques pour une forte efficacité de



transfection. Sans modification, les complexes de PLL/ADN ne sont pas de bons candidats pour la transfection *in vivo*.

### 3. Chitosanes

Les chitosanes sont des polysaccharides linéaires dérivés de la désacétylation de la chitine naturelle (Figure 11). Il est constitué de deux sous-unités : la D-glucosamine et la N-acetyl-D glucosamine liées par une liaison glucosidique. Biodégradable, et non toxique il possède une faible immunogénicité (Borchard, 2001).

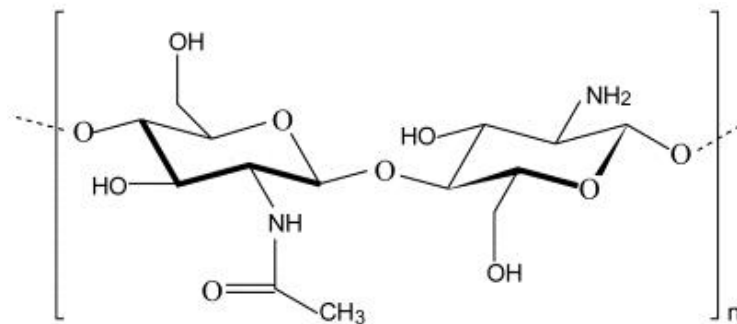


Figure 11 : Structure d'un chitosane

Comme il a été décrit dans de nombreuses revues (Borchard, 2001; Janes et al., 2001), l'efficacité de transfection des complexes chitosane/ADN dépendent de nombreux facteurs incluant, le poids moléculaire, le degré de désacétylation, le ratio N/P.... Il existe une corrélation entre l'endocytose des complexes, le taux de transfection, le rapport N/P et le potentiel de surface du complexe.

### 4. Cyclodextrines

Les cyclodextrines sont une série d'oligosaccharides cycliques provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon (Figure 12). Les trois cyclodextrines naturelles les plus courantes se composent de 6, 7 ou 8 unités de  $\alpha$ -D-glucopyranose reliées entre elles par des liaisons  $\alpha$ -1,4. Elles sont dénommées respectivement  $\alpha$ -,  $\beta$ - ou  $\gamma$ -cyclodextrines. Elles possèdent une cavité interne apolaire et donc hydrophobe et une surface externe polaire hydrophile.

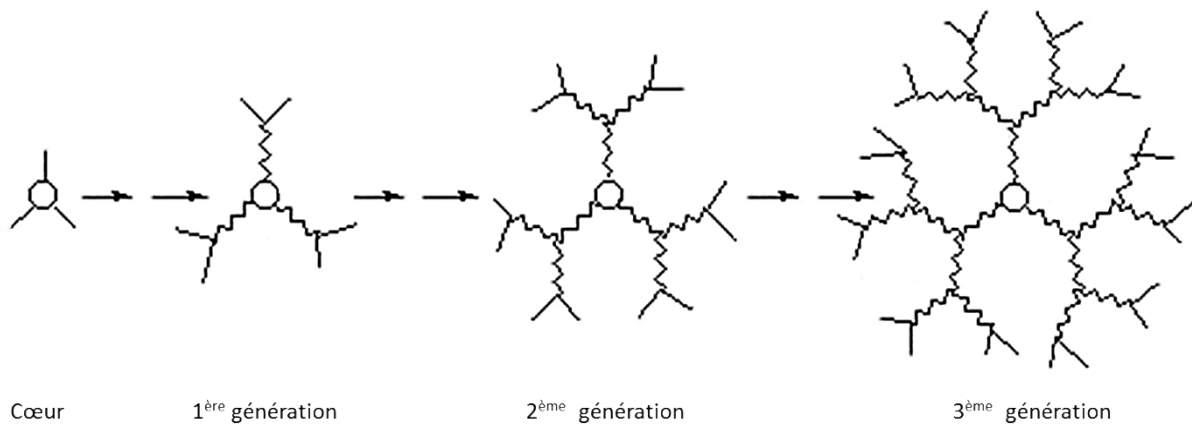


**Figure 12 : Structure d'une cyclodextrine**

Elles sont très efficaces pour l'internalisation de petits ARN interférents (siRNA), avec une toxicité moindre que celle des polymères cationiques non modifiés (Kulkarni et al., 2012). Un polymère à base de cyclodextrines a été utilisé dans un essai clinique de phase Ib pour vectoriser un siARN dirigé contre l'oncogène de la sous-unité de la ribonucléotide réductase (RRM2). Les nanoparticules employées pour la vectorisation de ce siARN dans les cellules cancéreuses sont composées, en plus du polymère à base de cyclodextrines, d'un ligand de ciblage, la transferrine, induisant la fixation de la nanoparticule sur le récepteur de la transferrine qui est surexprimé par les cellules tumorales.

## 5. Dendrimères

Les dendrimères sont constitués de sucres (glycodendrimères), de peptides, d'amidoamines (PAMAM) ou encore de propylénimine. Ce sont des macromolécules constituées de monomères qui s'associent de façon ramifiée autour d'un cœur central plurifonctionnel. La construction arborescente s'effectue par la répétition d'une même séquence de réactions jusqu'à l'obtention, à la fin de chaque cycle réactionnel, d'une nouvelle génération et d'un nombre croissant de branches identiques. Après quelques générations, le dendrimère prend généralement une forme sphérique globulaire, hautement ramifiée et plurifonctionnalisée (Figure 13).



**Figure 13 : Structure de dendrimère**

Deux classes sont utilisées très fréquemment en transfection du fait de leurs propriétés chimiques : les polyamidoamines (Haensler and Szoka, 1993) et les polypropylénimines (Zinselmeyer et al., 2002). Ce sont des dendrimères dont le monomère est un amidoamine. C'est la présence de nombreuses fonctions amines secondaires et tertiaires qui les rend efficaces pour la transfection. Les groupements amines terminaux permettent l'interaction avec les groupements phosphates de l'ADN. L'ADN s'enroule autour des dendrimères pour former des complexes. Les molécules reprennent alors une forme développée. Ce phénomène de gonflement des polymères participe au gonflement des endosomes qui mènera à leur éclatement et à la libération des complexes dans le cytoplasme.

#### 6. Copolymères à blocs

Les copolymères à blocs amphiphiles sont constitués de blocs hydrophiles de poly-oxyde d'éthylène (PEO) et de blocs hydrophobes de poly-oxyde de propylène (PPO), et liés de façon covalente entre eux par diverses structures. Les copolymères à blocs chargés forment une structure en X composée de quatre fragments PEO-PPO liés par l'extrémité hydrophobe supérieure à un noyau central d'éthylènediamine (Pitard, 2004).

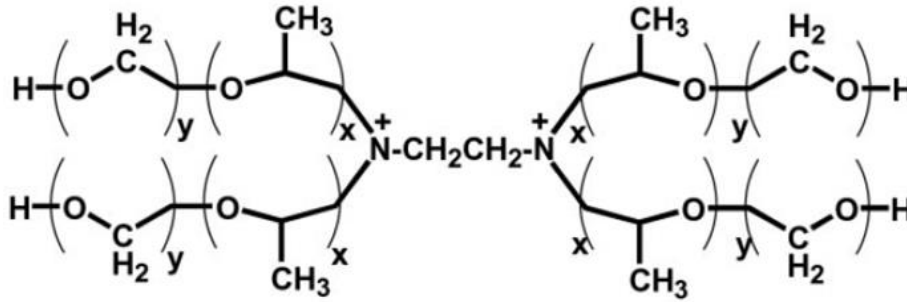


Figure 14 : Exemple de copolymères à blocs (D'après Pitard, 2004)

Les copolymères à blocs ont été utilisés avec succès pour augmenter l'efficacité de délivrance de gènes thérapeutiques dans divers organes de rongeur, y compris les muscles squelettiques et cardiaques, poumons et yeux (Desigaux et al., 2005; Lemieux et al., 2000; Pitard, 2004; Pitard et al., 2002). Les copolymères à blocs ont également été utilisés pour délivrer des gènes afin d'exprimer des protéines thérapeutiques chez des souris modèles (érythropoïétine) et pour des pathologies humaines (anémie d'insuffisance rénale, dystrophie musculaire de Duchenne) (Richard et al., 2005; Richard-Fiardo et al., 2008).

## B. Lipides cationiques

Le transfert de gènes médié par des lipides cationiques ou la lipofection est le système de délivrance de gènes le plus utilisé. Les formulations de lipides cationiques les plus utilisées pour des systèmes de délivrance de gènes sont les liposomes (vésicules uni ou multilamellaire), micelles... Dans ce paragraphe, nous décrivons la structure de ces vecteurs et présenterons leurs caractéristiques.

### 1. Structure

Au début des années 80, des liposomes ont permis de délivrer des acides nucléiques avec une efficacité similaire au phosphate de calcium (Fraleigh et al., 1980). D'après ces résultats, des chercheurs ont développé des molécules alliant une charge cationique permettant la formation d'un complexe avec les acides nucléiques et une partie hydrophobe autorisant la formation de structure supramoléculaire et la fusion avec les membranes cellulaires (Felgner et al., 1987). Ces molécules amphiphiles comprennent un domaine hydrophobe avec une ou deux chaînes d'acides gras ou un cholestérol, un groupe de tête

polaire à charge positive et un bras espaceur fonctionnel reliant le groupe polaire à la fraction hydrophobe (Figure 15).



Figure 15 : Structure d'un lipide cationique

a. Tête cationique

Le groupe de tête hydrophile est responsable de l'interaction avec l'ADN. La partie polaire de ces lipides est généralement basée sur des fonctions azotées comme les amines (aminoacides, polyamines, aminoglycosides) ou les guanidines, qui sont protonées et donc positivement chargées à pH physiologique (Labas et al., 2010) (Figure 16).

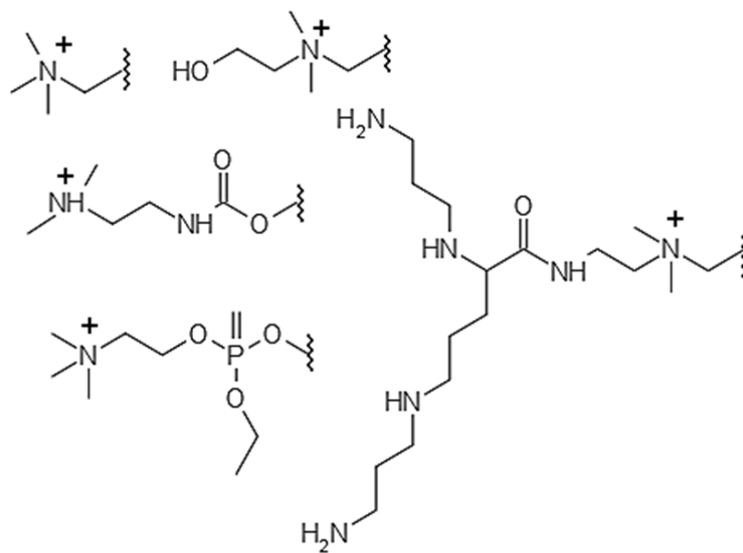


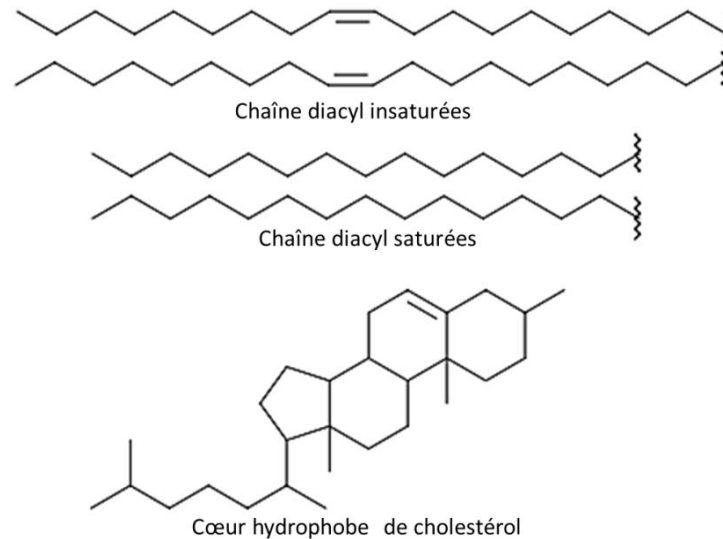
Figure 16 : Exemple de composants pour la tête cationique (Koynova and Tenchov, 2010)

Etant donné que les lipides cationiques possédant une tête polaire d'aminoglycosides sont le point central de mes travaux de thèse, ils seront détaillés dans le chapitre suivant.

b. Queue hydrophobe

Le domaine hydrophobe est habituellement dérivé de chaînes hydrocarbonées aliphatiques. La partie hydrophobe des lipides cationiques permet leur auto-assemblage sous forme de micelles ou de liposomes et dans une certaine mesure, la fusion de ces

structures supramoléculaires avec les membranes plasmiques. Cette partie est généralement constituée de queues lipophiles dérivées de composants de membranes biologiques (par exemple, des phospholipides, du cholestérol, des lipides bipolaires...) (Figure 17).

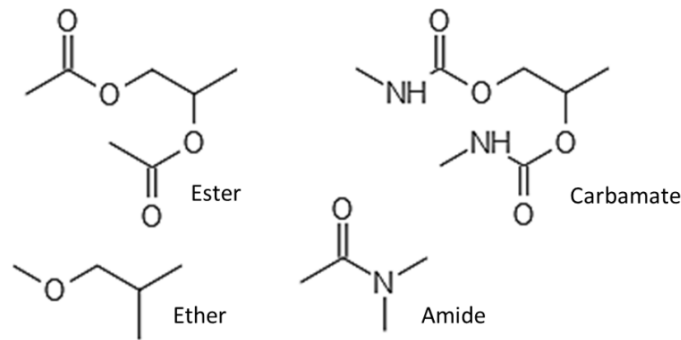


**Figure 17 : Exemple de composants de la partie hydrophobe (Koynova and Tenchov, 2010)**

La partie hydrophobe est souvent constituée par une ou deux chaînes d'acide gras de 12 à 18 atomes de carbone en longueur (C<sub>n</sub>). Les acides gras utilisés le plus fréquemment sont l'acide oléique (C18:1), l'acide palmitique (C16) ou l'acide myristique (C14) (Felgner et al., 1994).

### c. Bras espaceur

Le groupe de liaison reliant la tête lipidique cationique avec le groupe hydrocarboné contrôle la biodégradabilité du lipide cationique. Ces domaines sont couramment composés d'éther, d'ester (SAINT-2), d'amide, de carbamate (Figure 18).



**Figure 18 : Exemple de composants des bras espaceur (Koynova and Tenchov, 2010)**

Les changements dans ces domaines peuvent faire varier l'efficacité de transfection de différents vecteurs. En effet, il a été montré qu'un lipide cationique contenant une liaison disulfure à l'intérieur du bras espaceur a une activité de transfection faible comparé au même lipide cationique ne possédant pas de pont disulfure (Kumar and Chaudhuri, 2004).

Une autre étude a pu mettre en évidence l'importance du bras espaceur (van der Gun et al., 2007). Le lipide cationique amphiphile SAINT-2: DOPE, qui possède un groupe ester dans le bras espaceur, est efficace pour la délivrance de protéines dans les cellules. Une efficacité d'administration égale *in vitro* et *in vivo* pour les protéines comme pour l'ADN et le siRNA a été démontré avec ce même système de transport (SAINT-2: DOPE). Ce vecteur lipidique présente le même niveau d'efficacité selon les molécules à délivrer.

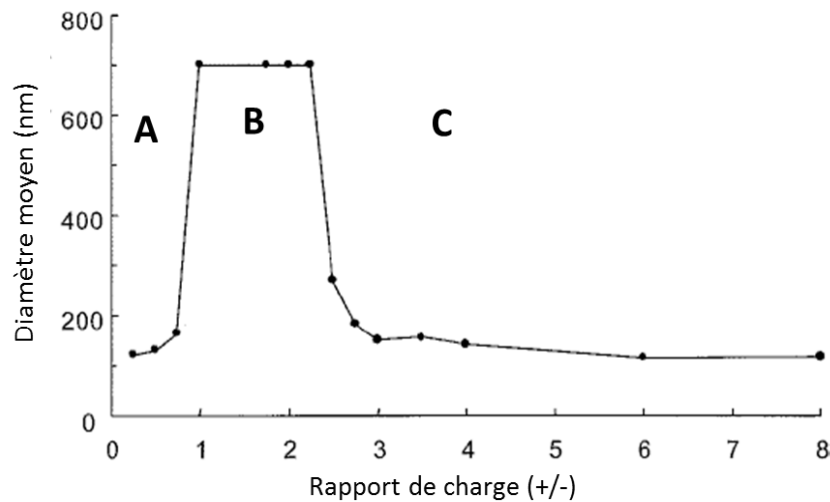
## 2. Caractérisation physico-chimiques

Les lipides cationiques établissent des liaisons électrostatiques et forment des complexes stables avec les acides nucléiques. Il existe différentes techniques pour caractériser ces complexes et comprendre ainsi les mécanismes impliqués dans leur formation. Les techniques permettant la mesure de la taille, la complexation avec l'ADN, la charge de surface ainsi que la morphologie des complexes seront décrits dans ce paragraphe.

### a. Taille des lipoplexes

Il a été montré que la taille et la charge de surface des complexes lipides cationiques/ADN dépendait du rapport de charge +/- qui conduit à la formation de complexes présentant des caractéristiques physico-chimiques ainsi qu'une stabilité colloïdale différentes (Barteau et al., 2008; Pitard et al., 2002). L'étude de la stabilité des

lipoplexes en fonction du rapport de charge est essentielle pour déterminer les conditions optimales de formulation conduisant à la meilleure efficacité de transfection.



**Figure 19 : Stabilité colloïdale (Pitard, 2002)**

Mesure par diffusion quasi-élastique de la lumière du diamètre de complexe plipopolyamine/ADN en fonction du rapport de charge. Les lipoplexes des zones A et C sont stables alors que ceux de la zone B sont colloïdalement instable et forment un précipité.

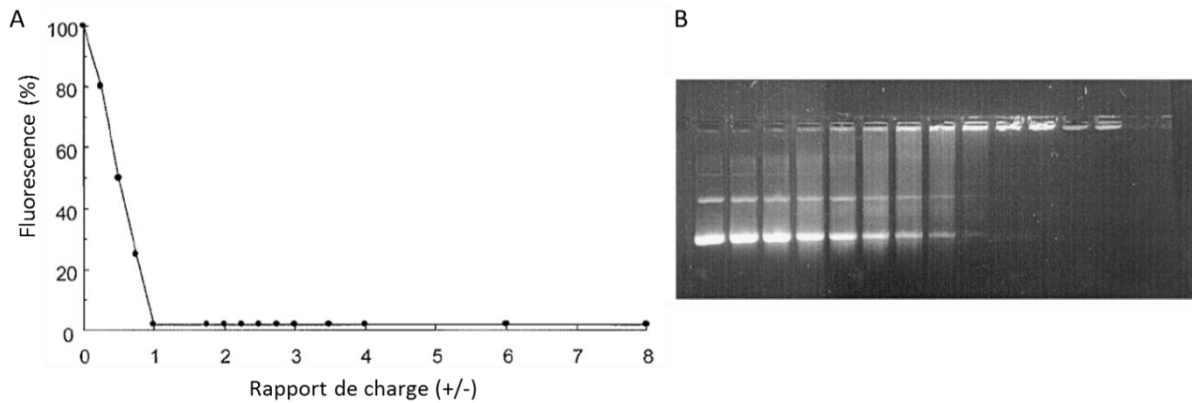
La Figure 19 montre trois zones de stabilité colloïdale : la zone A où le rapport de charge est inférieur à 1, l'ADN est en excès et donne lieu à une suspension colloïdalement stable en raison des répulsions électrostatiques. La taille des particules obtenue est comprise entre 100 et 200 nm. Dans cette zone, l'ADN n'est pas totalement compacté et donc il y a des risques de dégradation par les nucléases *in vivo*. La zone B où les charges apportées par le lipide et l'ADN se neutralisent, se caractérise par une précipitation du système. La zone C où le rapport de charge est supérieur à 3 permet de retrouver une zone de stabilité colloïdale grâce à l'excès de charges positives. La taille des particules se situe entre 50 et 150 nm. L'ADN est totalement compacté et si l'injection *in vivo* est possible, la présence des charges positives à la surface des particules présente toutefois des risques de toxicité.

Le rapport de charge n'est pas le seul paramètre à influencer la structure des lipoplexes. L'augmentation de la concentration en NaCl, la longueur de la chaîne aliphatique, le pH et la concentration en ADN agrègent les lipoplexes (Turek et al., 2000).



## b. Complexation

La complexation des molécules d'ADN au sein des lipoplexes peut être analysée par des expériences de fluorescence. Cette technique est utilisée pour évaluer la condensation de l'ADN dans la formation d'agrégats. Les lipoplexes sont exposés au bromure d'éthidium (BET) (jouant le rôle de sonde fluorescente), qui s'intercale entre les paires de base d'ADN et il a la émet un signal de fluorescence à 590 nm (Figure 20).



**Figure 20 : Etude de la complexation avec le BET (Pitard, 2002)**

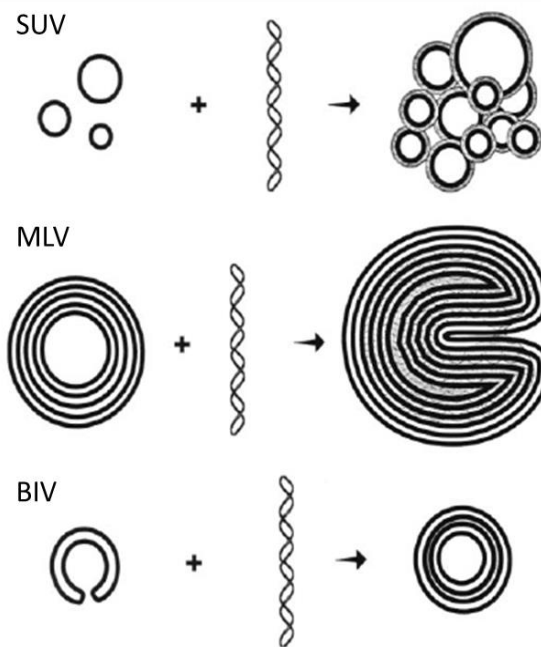
(A) Mesure de fluorescence du BET dans une suspension de complexe lipopolyamine/ADN en fonction du rapport de charge. (B) électrophorèse sur gel d'agarose de complexe lipopolyamine/ADN à différents rapports de charge (+/-) compris entre 0 et 8.

Si l'ADN est complexé, il n'est plus accessible au BET et on ne mesure plus aucun signal de fluorescence. Il a été montré que lorsque le rapport de charge augmente, l'intensité de fluorescence du BET diminue. Un gel d'électrophorèse sur gel d'agarose avec du BET a été utilisé pour suivre plus précisément la condensation de l'ADN par les molécules cationiques. Seules les molécules d'ADN seules peuvent migrer et être détectées sur le gel. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus avec les expériences de fluorescence.

En reliant les résultats de l'étude de la complexation et de la stabilité colloïdale, on peut dire que la totalité des molécules d'ADN sont complexées au sein des lipoplexes dans la zone B et C. Cela suggèrent que les objets de la zone B et C présentent la capacité de complexer les molécules d'ADN au sein de leurs assemblages supramoléculaires et donc de les protéger de la dégradation par les nucléases.

## c. Morphologie et structure

L'organisation des complexes lipides cationiques/ADN peut être déterminé en utilisant la diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS). La structure des lipides cationiques est modifiée en présence d'ADN. Il y a un réarrangement structural reposant sur la fusion des lipides cationiques et la condensation d'ADN (Gershon et al., 1993). Plusieurs organisations ont été décrites en fonction de la nature et de l'organisation structurale des lipides cationiques (Templeton, 2002) (Figure 21) :



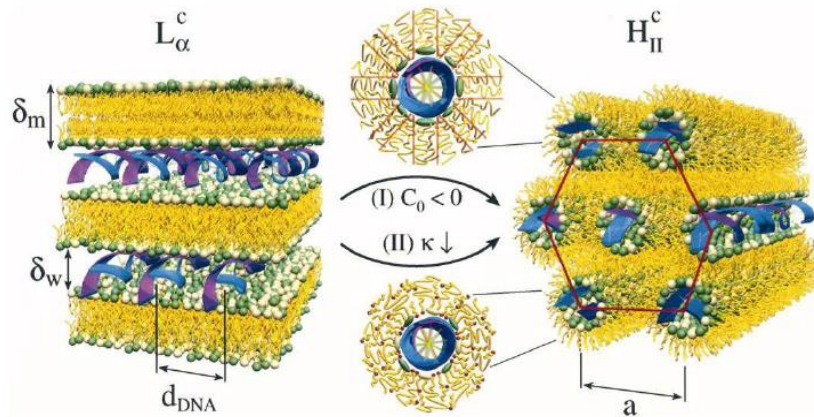
**Figure 21 : Schéma représentant des sections transversales à travers des films vitrifiés de différents types de liposomes et de complexes ADN/liposomes (Templeton, 2002)**

SUV sont de petites vésicules unilamellaires qui condensent les acides nucléiques sur la surface et produit des «Spaghettis et boulettes de viande». Les MLV sont des vésicules multilamellaires qui apparaissent comme des «rouleaux suisses» après mélange avec l'ADN. Les BIV sont bilamellaires invaginées et encapsulent efficacement les acides nucléiques entre deux structures bilatérales invaginées.

- Les SUV (petites vésicules unilamellaires) condensent l'ADN, on obtient des structures tubulaires (spaghetti) et sphériques (meatballs) (Sternberg et al., 1994)
- Les MLV (vésicules multilamellaires) ou structures bilamellaires (BIV) complexées avec l'ADN forment des structures bilamellaires intercalant l'ADN entre deux couches lipidiques (Templeton et al., 1997). Il a été montré par (Rädler et al., 1997) que les lipoplexes présentait une structure particulière dans laquelle l'ADN s'intercalait entre les bicouches lipidiques . Les résultats obtenus par diffraction aux rayons X,

montrent une structure avec alternance de bicouches lipidiques et de couches d'ADN. Ces résultats ont pu être observés avec le lipide DOTAP ou le lipide BGTC complexé avec l'ADN (Pitard et al., 1999).

- Certains lipoplexes forment des structures de type hexagonal inversé (Koltover et al., 1998). Par exemple, le lipoplexe formé de DOTAP et d'un colipide neutre DOPE présente une structure hexagonale inversée.

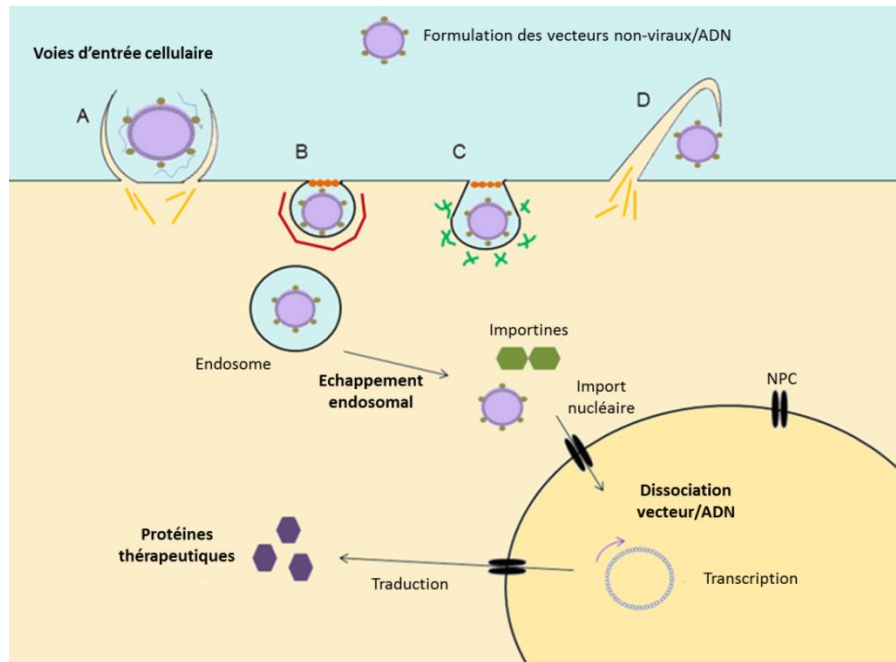


**Figure 22 : Représentations schématiques de la phase lamellaire  $L_{\alpha}^c$  et de la phase hexagonale inverse  $H_{II}^c$  (Koltover et al., 1998).**

Les lipides sont représentés en jaune (queue hydrophobes) et vert/blanc (têtes hydrophiles).

### C. Mécanisme d'action

Les mécanismes de la délivrance des gènes par des vecteurs synthétiques incluent plusieurs étapes représentées sur le schéma suivant (Figure 23). Les complexes vecteurs/molécules sont capturés dans les cellules par une voie d'endocytose, qui est l'un des mécanismes d'internalisation de la cellule. Une fois internalisés par la cellule, ces complexes se retrouvent dans des vésicules d'endocytoses. Les endosomes maintiennent leur pH interne autour de 5 à l'aide de pompes à protons (Mindell, 2012). Les complexes endocytés doivent échapper à la dégradation endolysosomale en sortant des compartiments endocytotiques avant la fusion avec les lysosomes. Les endosomes peuvent fusionner avec les lysosomes, compartiment contenant certaines enzymes digestives pour la dégradation. Une fois, sortie de l'endosome, les complexes doivent se dissocier afin de libérer la molécule à délivrer. Selon la nature de la molécule, une étape dans le noyau sera nécessaire avant d'obtenir une protéine thérapeutique.

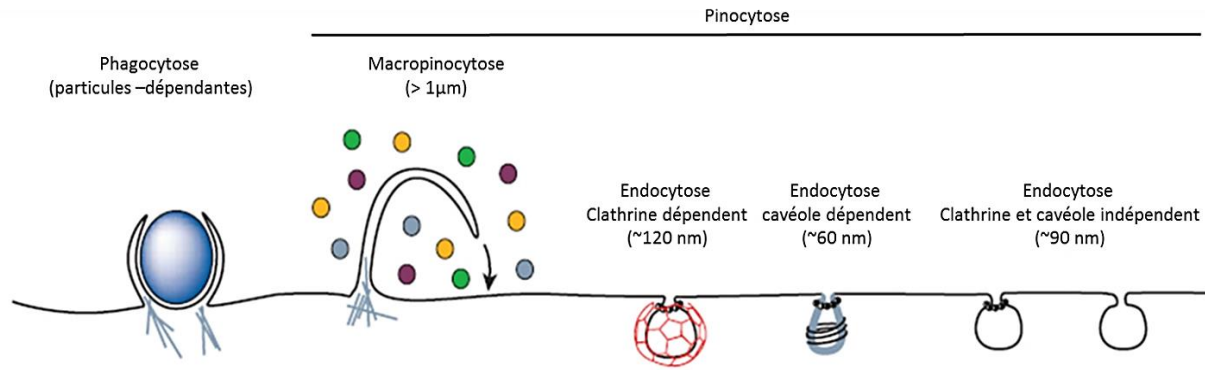


**Figure 23: Voies d'entrée cellulaire et trafic intracellulaire du système de délivrance non-virale (D'après Villate-Beitia et al., 2015).**

(A) Phagocytose (B) Endocytose Clathrine-dépendante (CME) (C) Endocytose Cavéole-dépendante (D) Macropinocytose. Les complexes vecteur/ADN internalisés qui suivent la voie CME s'échappent des endosomes et peuvent être transportés dans le noyau par les importines s'ils contiennent un NLS. Lorsque le vecteur et l'ADN se dissocient l'un de l'autre, le transgène est exprimé dans les cellules cibles. Les filaments jaunes représentent l'actine; La chaîne rouge représente la couche de clathrine; les filaments verts représentent la caveoline dimères; Les petits cercles orange représentent la dynéine, petite GTPase; Les filaments bleus représentent les opsonines.

### 1. Internalisation

L'endocytose est une voie d'entrée cellulaire majeure pour la délivrance de molécules par des vecteurs synthétiques (Khalil et al., 2006; Pathak et al., 2009). Plusieurs types de voies d'entrée sont connus pour l'internalisation incluant la phagocytose, la macropinocytose, l'endocytose dépendante de la clathrine (CME) et l'endocytose dépendante des cavéoles (CvME) (Conner and Schmid, 2003) (Figure 24). D'autres voies d'endocytoses indépendantes de la clathrine et des cavéoles existent mais peu d'études font état de leur implication dans le transfert de gènes. La contribution de chaque voie dans l'internalisation des vecteurs synthétiques n'est pas clairement comprise due à la diversité des vecteurs (Morille et al., 2008).



**Figure 24 : Multiples entrée dans la cellule de mammifère (D'après Conner and Schmid, 2003)**

L'endocytose peut se produire par plusieurs mécanismes distincts, qui sont généralement divisés en deux grandes catégories: la phagocytose, un processus restreint aux cellules de mammifères spécialisées; Et la pinocytose, qui inclut la macropinocytose, l'endocytose médiée par la clathrine (CME), l'endocytose médiée par les caveolae (CvME). Les voies endocytaires diffèrent par la taille et la structure des vésicules, la nature de la charge, ainsi que sur le mécanisme de formation des vésicules.

#### a. Phagocytose

La phagocytose est un englobement et une internalisation des particules. Chez les mammifères, la phagocytose est effectuée par les cellules spécialisées tels que les macrophages, les monocytes et les neutrophiles pour nettoyer des débris cellulaires issues des cellules apoptotiques et éliminer les pathogènes. La phagocytose est initiée par la reconnaissance de particules à la membrane cellulaire via le recrutement de récepteurs de surface (Areschoug and Gordon, 2009). Cela implique le réarrangement de l'actine contrôlée par les RhoGTPase conduisant à l'extension et à l'englobement des particules. La taille, la géométrie, l'angle de contact, la rigidité et la topographie (Champion and Mitragotri, 2006; Underhill and Goodridge, 2012) de la cible influencent la phagocytose et peut avoir un impact sur l'internalisation des systèmes de délivrance. Les vésicules résultantes ou les phagosomes, mûrissent et fusionnent avec les lysosomes où l'environnement acide et les multiples enzymes promeuvent la dégradation des particules et de leurs contenus.

#### b. Pinocytose

La pinocytose comprend plusieurs voies d'internalisation : la macropinocytose, la voie dépendante de la clathrine (CME) et la voie dépendante des cavéoles (CvME) (Conner and Schmid, 2003) (Figure 24).

### i. Macropinocytose

La macropinocytose conduit à la formation de grandes vésicules endocytaires générées par des stimulations (facteurs de croissance et autres signaux). Ce phénomène est contrôlé par l'activation de la famille des petites Rho-GTPases. Les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique, formant de larges macropinosomes ( $> 0.2 \mu\text{m}$ ) (Conner and Schmid, 2003; Kerr and Teasdale, 2009). Les macropinosomes fusionnent avec les compartiments de dégradation de la cellule.

Une étude a mis en évidence l'implication de la macropinocytose dans l'internalisation de complexes polymère/ADN. Cette voie contribue à l'entrée cellulaire de l'ADN plasmidique complexé avec la polylysine histidylée (Goncalves, 2004).

Pour élucider le mécanisme d'entrée des lipoplexes dans les cellules, de nombreuses études utilisent des inhibiteurs chimiques spécifiques des voies d'endocytose. Il est possible de bloquer la macropinocytose en utilisant par exemple l'amiloride. Cet inhibiteur chimique inhibe l'échangeur sodium/protons. Cet échangeur est fortement impliqué dans la formation des macropinosomes. Cependant, le mécanisme d'action de l'amiloride sur la macropinocytose reste inconnu. (Grinstein et al., 1989; Koivusalo et al., 2010; Orlowski and Grinstein, 2004).

### ii. Voie dépendante de la clathrine (CME)

La CME est un processus définie comme l'internalisation via la formation de vésicules recouvertes de clathrine à la membrane plasmique. Cette voie, commune à toutes les cellules eucaryotes, peut être constitutive ou stimulée par des liaisons de ligands. La clathrine est une protéine se polymérisant elle-même qui peut former un manteau polygonal comme une cage. La clathrine est reliée à une protéine adaptatrice tels qu'AP-2 et les protéines chaperonnes qui se lient à la membrane plasmique. La première étape dans la CME est la forte liaison d'un ligand à un récepteur de surface cellulaire spécifique. Cela déclenche l'accumulation localisée de structures de clathrine sur la surface cytoplasmique qui aide à déformer la membrane et former les puits recouverts de clathrine (environ 100 à 150 nm). La dynamine est recrutée au col de la vésicule où elle polymérise et agit sur la scission de la membrane. Après scission de la membrane cellulaire, une gamme de protéines chaperonnes est responsable de tenir le cytosquelette d'actine ensemble et aident à la

migration endosomale (Robinson, 2004). Le pH acide dans les endosomes semble provoquer la dissociation des ligands de leurs récepteurs. Ensuite, la clathrine est recyclée pour former de nouvelles vésicules enduites de clathrine. Des endosomes, le cargo internalisé est renvoyé à la surface de la cellule ou trié dans des corps multivésiculaires et des lysosomes pour la dégradation (McMahon and Boucrot, 2011; Traub, 2009, 2011).

Une étude sur l'internalisation de l'ADN par des systèmes lipidiques et polymériques a montré que les complexes pouvaient traverser les membranes cellulaires par le biais de la CME. Le complexe formé avec le polymère His-1PEI ou avec le lipide cationique DOSP :MM27 dans des cellules musculaires lisses empruntaient la CME pour entrer dans la cellule et délivrer l'ADN (Billiet et al., 2012).

Il existe de nombreux inhibiteurs de la CME notamment la chlorpromazine. La chlorpromazine transloque la clathrine et les protéines associées aux vésicules intracellulaire en supprimant ainsi la formation des puits recouverts de clathrine (Sevimli et al., 2015; Wang et al., 1993).

### iii. Voie dépendante des cavéoles (CvME)

Les cavéoles sont des domaines de la membrane plasmique enrichies en cholestérol et caractérisées par leur morphologie distincte (invagination de 60-80nm) et leurs signatures protéiques (Parton and del Pozo, 2013). La famille de protéines recouvrant les cavéoles appelée cavéolines sont des protéines membranaires, et les cavines sont des protéines cytoplasmiques qui forment des hétérodimères s'associant avec les cavéolines et régulant leurs dynamiques et leurs fonctions. L'endocytose cavéolaire est accompagnée par une phosphorylation de la cavéoline-1 par une tyrosine kinase. Le trafic cavéolaire est contrôlé par le cytosquelette et les fibres de stress, les microtubules et les filaments intermédiaires (Santilman et al., 2007; Stahlhut and van Deurs, 2000; Wickström et al., 2010).

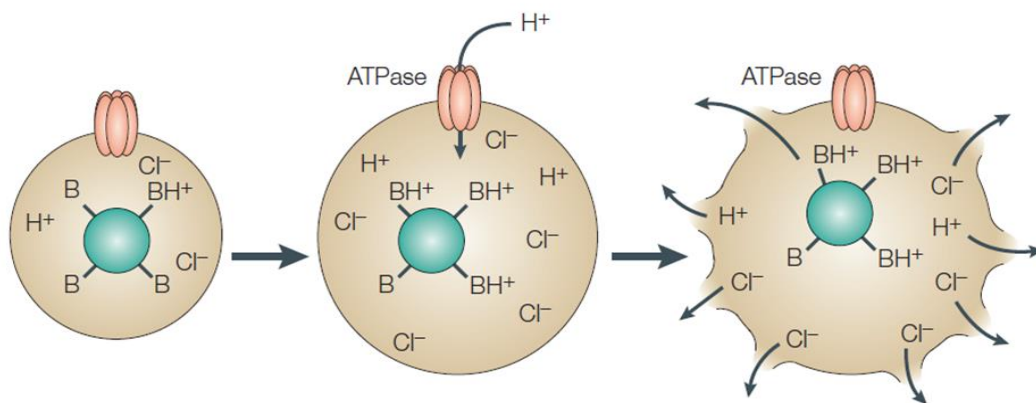
La génistéine, inhibiteur de la voie cavéole, inhibe les tyrosines kinases perturbant ainsi le cytosquelette d'actine localement. Ceci a pour conséquence la perturbation du trafic des cavéoles (Nabi and Le, 2003; Sevimli et al., 2015).

## 2. Echappement endosomal

L'internalisation de vecteurs par endocytose conduit à l'emprisonnement de macromolécules dans les endosomes. La sortie des endosomes constitue l'une des principales barrières de transfert de gènes des vecteurs synthétiques, avec un impact non négligeable sur l'efficacité des systèmes. En effet, même si une forte internalisation des complexes est observée, seule une infime fraction parvient à gagner le cytosol, la majeure partie étant piégée au niveau endosomal. Différents systèmes tentent de promouvoir l'échappement de l'endosome selon le type de vecteur internalisé (Mundra and Mahato, 2014) et ils sont présentés dans ce paragraphe. Par exemple, le mécanisme d'éponge à protons a été proposé pour les polymères cationiques tels que les polyéthylémines (Behr, 1997) et les polyamidoamines. Pour les systèmes de délivrance basés sur des lipides cationiques, le mécanisme de « flip-flop » peut être proposé pour l'échappement endosomal (Xu and Szoka, 1996). On retrouve également des systèmes impliquant des agents endosomolytiques.

### a. Eponge à protons

Le phénomène d'éponge à protons (Figure 25) a été mis en évidence dans certains polymères cationiques avec une forte capacité tampon.



**Figure 25 : Schéma représentant le mécanisme d'éponge à protons (Pack et al., 2005)**

La protonation de l'éponge protonique des polymères (vert) provoque un afflux accru de protons dans les vésicules endocytaires. L'augmentation de la pression osmotique provoque un gonflement et une rupture de la vésicule.

Ces polymères habituellement contiennent des groupements amines secondaires et/ou tertiaires protonables avec un  $\text{pK}_a$  proche du  $\text{pH}$  endosomal/lysosomal. Durant la

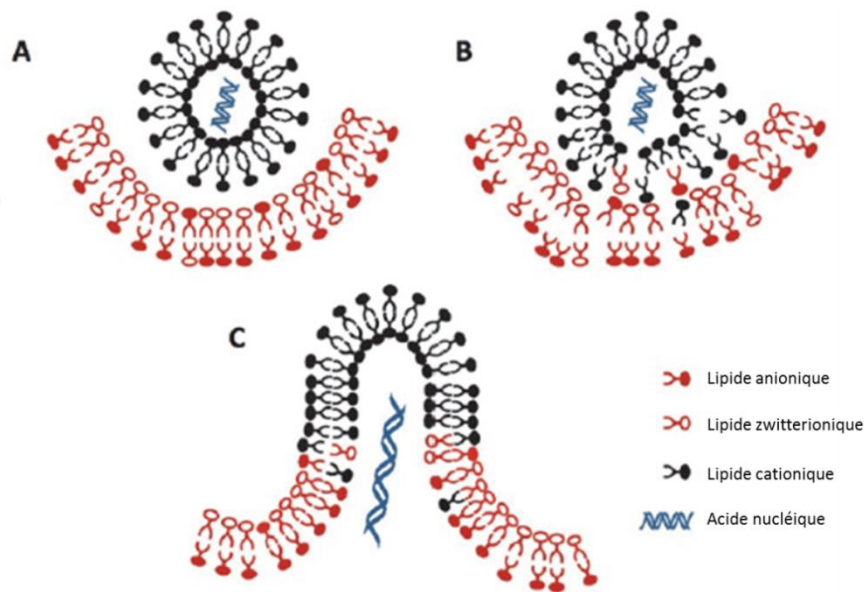


maturation des endosomes, les pompes à protons ATPase liées à la membrane transloquent activement les protons du cytosol dans l'endosome, conduisant à l'acidification du compartiment endosomal et l'activation des enzymes hydrolytiques. A ce stade, les polymères sont protonés et résistent à l'acidification des endosomes. L'action de pompage des protons est suivie par l'entrée passive des ions chlorure, augmentant la concentration ionique et conduisant à l'afflux d'eau. La pression osmotique cause le gonflement et la rupture des endosomes, relarguant leurs contenus dans le cytosol (Behr, 1997). Les vecteurs polymériques qui ne possèdent pas les propriétés tampon de pH échouent à délivrer les acides nucléiques parce qu'ils sont dans l'incapacité d'induire l'échappement endosomal même si ils sont capable de se lier aux acides nucléiques de promouvoir l'entrée intracellulaire (Kloekner et al., 2006). L'histidine est communément l'une des molécules employées qui, ajoutée à un groupe de polymères fonctionnels ou incorporée à des séquences peptidiques, améliore leur capacité tampon de pH. La capacité tampon de l'histidine est due à la présence de l'anneau imidazole qui a un pKa autour de 6 et peut être protonée à un pH légèrement acide (Midoux et al., 2009). Une fois les groupes imidazoles protonés, les résidus histidines déclenchent la déstabilisation des polyplexes et la fusion avec la membrane endosomale, conduisant au relarguage des polyplexes dans le cytosol. Il est évident que l'histidine peut faciliter l'échappement de l'ADN des endosomes en augmentant la capacité tampon dans les compartiments acides. Une approche similaire a été adoptée par d'autres chercheurs pour améliorer les autres polycations en introduisant des fractions imidazoles pour améliorer la capacité tampon du pH et promouvoir l'échappement endosomal (Moreira et al., 2009; Yang et al., 2006).

#### b. Mécanisme de « flip-flop »

Le mécanisme de « flip-flop » (Figure 26) repose sur la capacité des lipides anioniques à se lier aux lipides cationiques formant ainsi un pore pour la sortie de la molécule. Ce système a été décrit pour l'internalisation de l'ADN dans des lipides cationiques (Zelphati and Szoka, 1996). Une fois les lipoplexes à l'intérieur de l'endosome, il y a des interactions électrostatiques entre les lipoplexes cationiques et les lipides chargés négativement de la membrane endosomale (côté cytoplasmique). Les lipides anioniques de la membrane endosomale diffusent latéralement dans les lipoplexes et forment des paires d'ions de charges neutres avec les lipides cationiques des lipoplexes. Il en résulte que les acides

nucléiques sont déplacés du lipoplexes, permettant les acides nucléiques d'être relargués dans le cytoplasme.



**Figure 26 : Schéma du mécanisme de « flip-flop » (Liang and W. Lam, 2012)**

(A) Les lipoplexes sont endocytés et sont piégés à l'intérieur des endosomes. (B) Il existe une interaction électrostatique entre les lipides cationiques et les lipides anioniques des lipoplexes qui sont présents dans le côté faisant face au cytoplasme de la membrane endosomale. Les lipides anioniques de la membrane endosomale se diffuse latéralement dans les lipoplexes et forme des paires d'ions neutralisés par la charge avec les lipides cationiques des lipoplexes. (C) Les acides nucléiques sont déplacés des lipoplexes permettant l'entrée des acides nucléiques dans le cytoplasme.

Le lipide neutre tel que la phosphatidyléthanolamine (DOPE) est utilisé comme colipide neutre en combinaison avec les lipides cationiques. Il est bien établi que l'inclusion de DOPE dans les lipoplexes peut significativement améliorer l'activité de transfection. En revanche, le remplacement de DOPE avec un autre phospholipide neutre diolephosphatidylcholine (DOPC) ne permet pas d'améliorer l'efficacité de transfection. Le rôle de DOPE comme colipide est attribué à son activité endosomolytique. Des expériences de microscopies électroniques à transmission ont mis en évidence le trafic intracellulaire des lipoplexes contenant DOPE. Ces lipoplexes peuvent déstabiliser la membrane endosomal alors que ceux contenant DOPC ne montrent pas le même effet (Zhou and Huang, 1994). La différence de DOPE et DOPC repose sur le groupement de la tête polaire. Le groupe éthanolamine de la tête polaire de DOPE a une forte tendance à former des phases hexagonales inversées à pH acide alors que le groupement choline de la tête polaire de DOPC non. Cette conformation

de DOPE joue un rôle important pour la dissociation des acides nucléiques des lipoplexes et dans l'efficacité de déstabilisation de la membrane endosomal (Zuhorn et al., 2005).

### c. Agents d'échappement endosomal

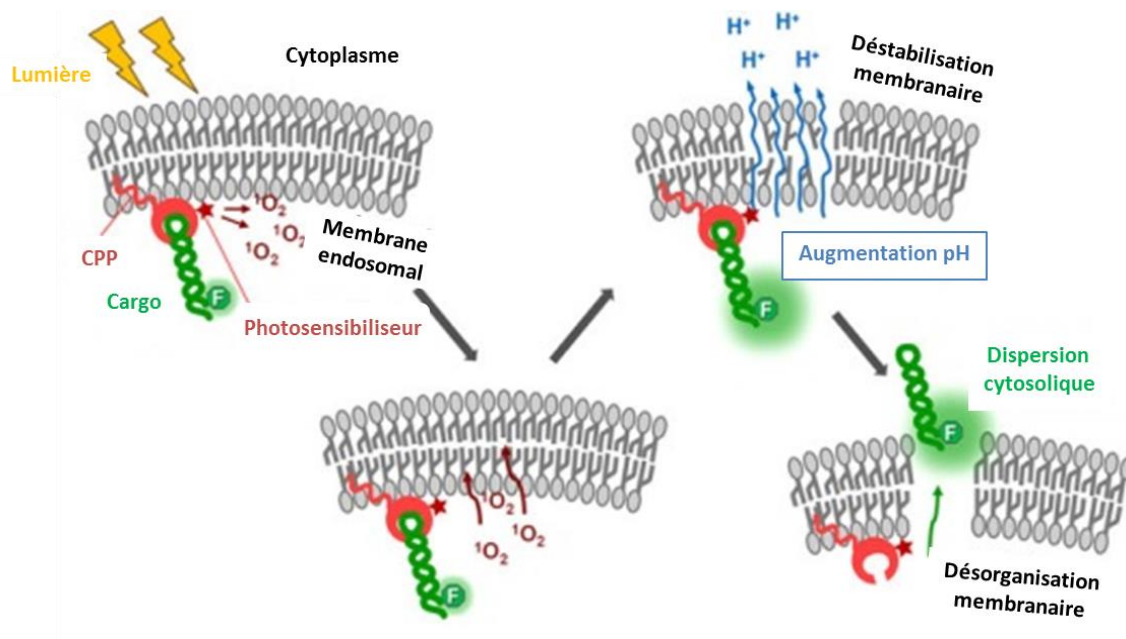
Plusieurs agents endosomolytiques ont été développés basé sur les propriétés fusogéniques de protéines ou la capacité de peptides à former des pores.

Par exemple, dans le but d'améliorer la libération endosomale d'ADN, des peptides fusogènes sensibles au pH ont été associés à des lipoplexes. Cette association entraîne une déstabilisation de la membrane endosomale par acidification. La sous-unité hémagglutinine HA2 du virus influenza change de conformation en réponse au pH acide du compartiment endosomal. Cela entraîne la fusion de la membrane virale avec la membrane endosomal et le relargage du matériel viral dans le cytosol. L'introduction de HA2 dans la structure de polyplexes (transferrine-PLL) a permis d'augmenter l'efficacité de transfection (Wagner et al., 1992).

Il a été montré également que certains peptides avaient la capacité à créer des pores. La formation de pores est basée sur l'interaction entre la tension membranaire qui élargit le pore et la tension de ligne qui ferme le pore. Quelques peptides ont une haute affinité pour le bord du pore et la liaison de ces peptides au bord du pore produit une réduction de la tension de la ligne. Des études ont rapporté que l'union des peptides cationiques amphiphiles à la bicouche lipidique produit une forte tension membranaire interne capable de créer des pores dans la membrane lipidique (Varkouhi et al., 2011).

Un autre mécanisme possible est la déstabilisation photochimique qui utilise des photosensibilisateurs endocytés pour déstabiliser la membrane endosomale (Liang and W. Lam, 2012). Les photosensibilisateurs sont localisés dans la membrane plasmique (Figure 27). Dans ce mécanisme, les photosensibilisateurs se lient et se localisent dans la membrane plasmique, et ils peuvent être pris par endocytose avec les systèmes synthétiques. Les photosensibilisateurs sont piégés dans les membranes endosomales et ils restent inactifs jusqu'à ce qu'elles soient déclenchées par la lumière à la longueur d'onde correspondant à leur spectre d'absorption (Selbo et al., 2010). Une fois activés, ils induisent la formation d'espèces hautement réactives d'oxygène (ROS), provoquant la rupture de la membrane des endosomes et des lysosomes. En conséquence, les macromolécules qui sont piégées à

l'intérieur des endosomes/lysosomes peuvent être libérées dans le cytosol (Liang and W. Lam, 2012).



**Figure 27 : Schéma du mécanisme d'internalisation photochimique (Ohtsuki et al., 2015)**

(i) la membrane endosomale a été déstabilisée; (ii) des protons ont été libérés de l'endosome, augmentant le pH interne des endosomes; et (iii) la membrane endosomale rompue et l'ARN de charge dispersé de l'endosome dans le cytosol.

### 3. Trafic intracellulaire du plasmide et importation nucléaire

Suite à l'échappement endosomal, les molécules délivrées doivent encore être dirigées vers leur cible. Selon leur devenir, les molécules doivent passer à travers les pores nucléaires pour atteindre le noyau. Pour les acides nucléiques, ils doivent atteindre le noyau pour être ensuite transcrit en ARN et en protéine. L'accès au noyau est limité par la consistance du cytosol donc la diffusion de macromolécules est difficile (Luby-Phelps, 2000). Ceci a pour conséquence que seulement une faible quantité de molécules d'ADN atteint le noyau. Il y a un très faible taux d'expression avec une injection cytosolique comparée à une injection intranucléaire (Graessmann and Graessmann, 1989). En revanche, les protéines qui sont destinées aux noyaux contiennent un signal de localisation nucléaire qui est abondant dans les acides aminés basiques et peut être reconnu par les protéines cytoplasmiques comme les importines. Il a été observé que des endosomes contenant les lipoplexes se situent à proximité de la membrane nucléaire suite à une transfection (Le Bihan et al., 2011),

ce qui peut faciliter la diffusion de l'ADN qu'ils relarguent et limiter son temps de résidence dans le cytosol où il est exposé à l'action des nucléases.

**Bilan des vecteurs synthétiques :**

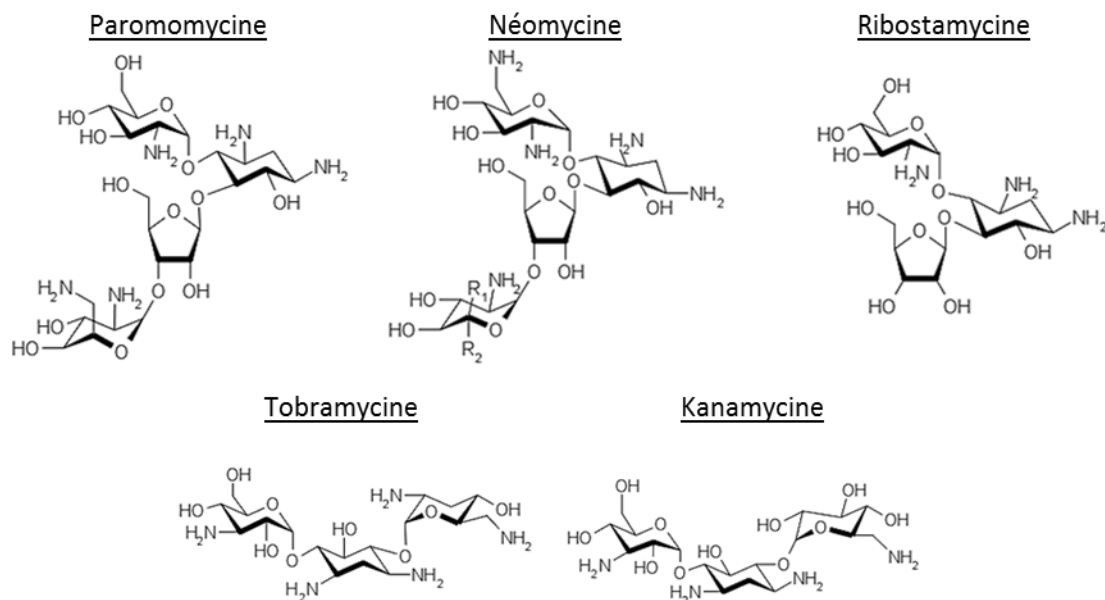
Malgré le potentiel important des lipides cationiques pour la délivrance de macromolécules, il existe peu de données concernant les propriétés physico-chimiques des complexes. Il a pourtant été observé dans le cas de la vectorisation des acides nucléiques que ces propriétés jouent un rôle crucial dans l'efficacité de tels vecteurs et il est donc nécessaire de définir leurs propriétés optimales pour la délivrance intracellulaire de macromolécules notamment les protéines. Même si l'efficacité est une notion relative, les paramètres morphologiques et structuraux nous aident à comprendre leur efficacité et permet de suggérer un mécanisme d'action.

## **Chapitre 4 : Dérivés lipidiques d'aminoglycosides**

### **A. Description**

Les aminoglycosides sont une grande famille de molécules à activité antibiotiques issus d'actinomycètes, basées sur des sucres modifiés. Depuis l'isolement de la streptomycine en 1944, une variété d'aminoglycosides a été introduite dans la chimiothérapie antimicrobienne. Ils exercent leur activité antibactérienne en se liant à l'ARN ribosomique bactérien (sous-unité 30S), ce qui conduit finalement à la perturbation de la biosynthèse des protéines (Moazed and Noller, 1987; Purohit and Stern, 1994).

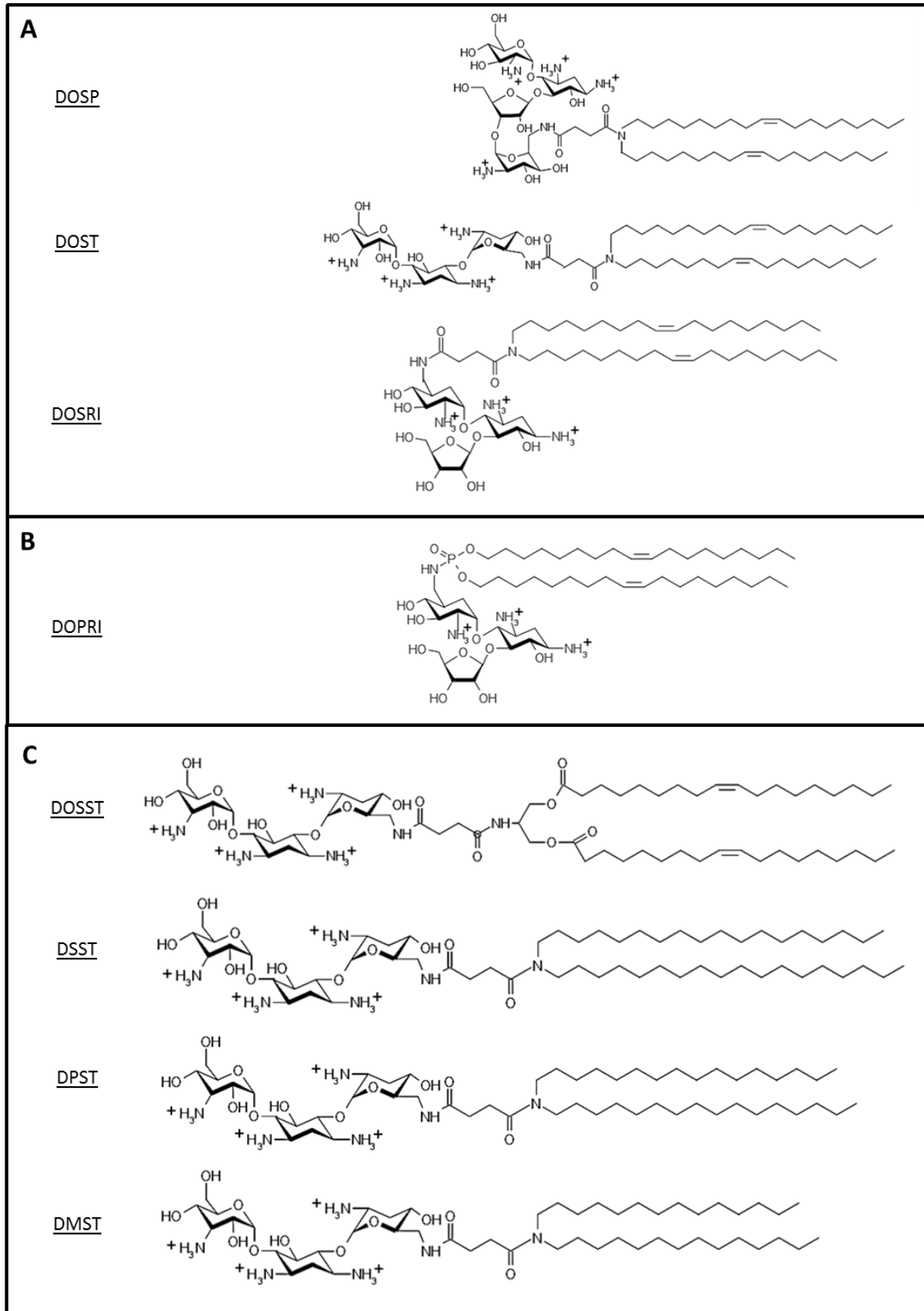
Les aminoglycosides sont des polyamines naturelles qui partagent tous des éléments structuraux communs. Ces molécules possèdent un cycle jusqu'à six chaînons avec des groupements amines auquel se lient par des ponts glycosidiques avec deux-trois sucres. Ces cycles peuvent porter des groupes amines et hydroxyles. Elles sont basées sur un noyau 2-déoxystreptamine, substituées en position 4 et 5 (4,5-DDS comme la paromomycine, tobramycine) ou en positions 4 et 6 (4,6-DDS comme la néomycine, kanamycine) par des aminosucres. Les nombreuses fonctions amines portées par ces sucres (jusqu'à six) permettent, par couplage sélectif avec un groupement hydrophobe (cholestérol ou chaînes d'acides gras), d'obtenir une grande variété de composés amphiphiles. Comme dans la structure des lipides cationiques, la tête polaire est reliée à une ou deux chaînes d'acides gras via un groupement espaceur. La famille des aminoglycosides offre l'avantage de pouvoir modifier la tête polaire en utilisant différents aminoglycosides (kanamycine, tobramycine, néomycine, paromomycine, ribostamycine) (Figure 28) qui sont connus pour interagir de manière spécifique avec les acides nucléiques.



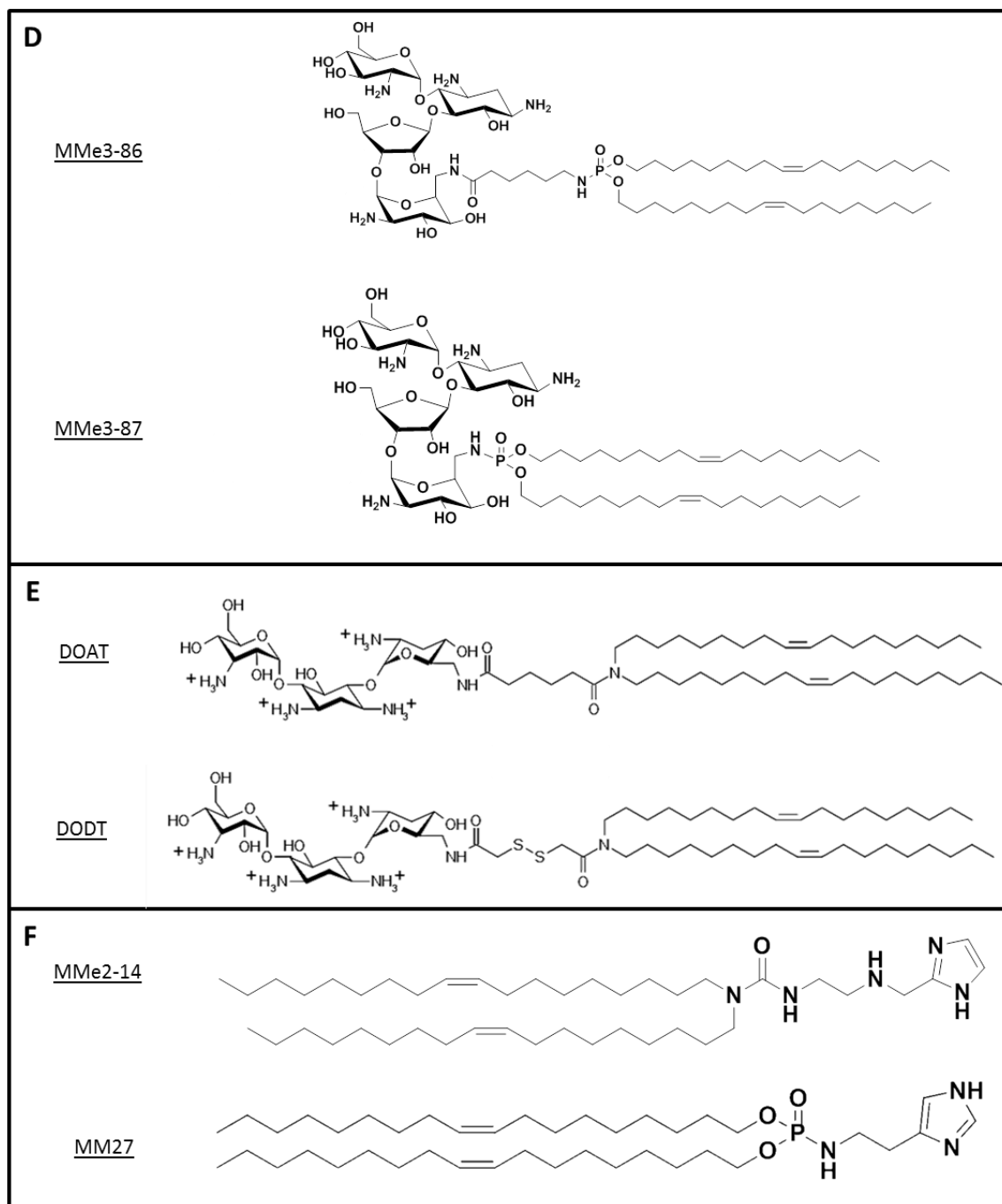
**Figure 28 : Différentes aminoglycosides pour la tête polaire des lipides cationiques.**

En plus de modifier la tête polaire de ces dérivés lipidiques, il est possible de modifier le bras espaceur au niveau de sa structure et de sa longueur mais également de jouer sur les chaînes d'acides gras (nature et longueur). La Figure 29 montre différentes formulations de vecteurs dérivés d'aminoglycosides utilisées au cours de ces travaux.

La modulation de ces vecteurs est un avantage pour le développement de nouveaux vecteurs synthétiques plus efficaces étant donné de la grande diversité de composés que l'on peut créer. La capacité des aminoglycosides à se lier aux acides nucléiques, alliée à leur importante diversité structurale permettant de nombreuses modifications chimiques, en fait des candidats de choix dans le développement de nouveaux lipides cationiques.







**Figure 29 : Différents vecteurs lipidiques dérivés d'aminoglycosides et colipides**

(A) même bras espaceur (succinyl) et même longueur de chaînes d'acides gras (C18) avec un tête cationique différente (paromomycine, tobramycine et ribostamycine) (B) DOPRI (C) même tête cationique (tobramycine) et même bras espaceur (succinyl) avec une longueur de chaînes d'acides gras différentes (C18, C16 et C14) (D) même longueur de chaînes d'acides gras et même tête cationique avec un même bras espaceur (phosphoramidate) seulement la longueur du bras espaceur varie (E) même tête cationique (tobramycine) et même longueur de chaînes d'acides gras (C18) avec des bras espaceur différents (adipic, pont disulfure, diester) (F) colipides neutres utilisés

## B. Etudes

Des études préliminaires avec un lipide cationique composé de la Kanamycine A et d'un dérivé de cholestérol (KanaChol), ont démontré la faisabilité d'utiliser un aminoglycoside au niveau du groupement de tête pour le transfert de gènes à la fois *in vitro* et *in vivo* (Belmont et al., 2002; Sainlos et al., 2003). En 2005, (Sainlos et al., 2005) ont étudié les propriétés de transfection d'une série de lipides dans lesquels la kanamycine est liée à divers bras espaceurs et chaînes lipophiles. Les résultats ont montré que la longueur et la nature du bras espaceur affectent les propriétés physico-chimiques et biologiques des lipoplexes. Ceci a conduit à synthétiser d'autres formulations dérivées de la kanamycine en modifiant la longueur de la chaîne aliphatique. Il s'est avéré que la chaîne aliphatique de 18 carbones est tout à fait appropriée pour contrebalancer le caractère hydrophile du groupement de tête aminoglycoside. Les résultats encourageants de transfection obtenus avec ces composés ont incités à évaluer le potentiel des lipides cationiques portant des groupes de tête basés sur d'autres aminoglycosides.

En 2007, (Desigaux et al., 2007) a étudié différents composés d'aminoglycosides en modifiant seulement la tête polaire (tobramycine, kanamycine, paromomycine et néomycine) pour la délivrance de siRNA *in vitro*. Il a été trouvé (i) que la complexation de siRNA avec des dérivés d'aminoglycosides lipidiques présentait un modèle de stabilité colloïdale comme pour l'ADN plasmidique (Pitard et al., 1997, 1999; Turek et al., 2000) et (ii) que les complexes lipides cationiques/siRNA, formés à des rapports de charge inférieurs, présentent une zone réduite d'instabilité colloïdale et ont des diamètres moyens plus faibles par rapport aux lipides cationiques à base de guanidinium (Pitard et al., 1999; Vigneron et al., 1996). La morphologie finale des particules auto-assemblées de siRNA condensées dépend du type d'aminoglycoside. Leur agencement supramoléculaire général consiste à des domaines lamellaires ordonnés avec un espacement régulier de 67 Å, indépendamment du fragment d'aminoglycoside.

Afin d'approfondir les connaissances sur ces vecteurs synthétiques, les propriétés de transfection génique de nouveaux lipides cationiques ont été étudié (Mével et al., 2012). Ces dérivés lipidiques d'aminoglycosides sont constitués d'un groupement cholestérol ou de chaînes d'acides gras liés par divers bras espaceurs à des groupes de tête (paromomycine ou

néomycine B). Ils ont démontré que ces nouveaux lipides cationiques sont efficaces pour la transfection génique à la fois *in vitro* et dans les voies aériennes de souris *in vivo*. Pour aller plus loin dans la compréhension des propriétés de ces vecteurs lipidiques, ces formulations ont été conjuguées avec un colipide, permettant d'améliorer l'efficacité de transfection. Que ce soit le dérivé portant les chaînes d'acides gras ou le groupement cholestérol formulé avec le colipide DOPE, il présente tous deux une forte expression du gène à la fois *in vitro* dans des lignées cellulaires et *in vivo* dans les voies aériennes de souris. Ensuite, comparant DOSP (paromomycine) et DOSN (néomycine) avec le même bras espaceur et la même chaîne hydrophobe, les résultats d'efficacité de transfection indiquent que l'augmentation du nombre de fonctions amines (au détriment de la fonction hydroxyl) peut réduire l'efficacité des vecteurs résultants.

Les résultats obtenus ces dernières années sur les dérivés d'aminoglycosides lipidiques pour la délivrance d'acides nucléiques ont permis de faire une avancée sur le développement de vecteurs synthétiques sûrs et efficaces. Les caractéristiques et la compréhension de ces nouveaux vecteurs en font des candidats de choix pour délivrer des macromolécules telles que des protéines.







## **Matériel & Méthodes**





## Matériel et Méthodes

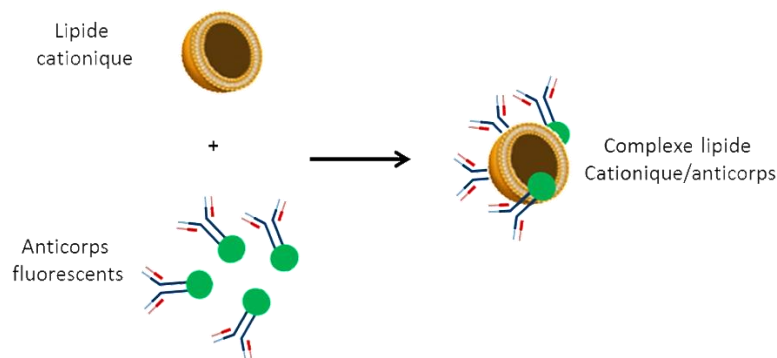
### A. Formulations lipidiques

La synthèse des lipides cationiques utilisés dans ces études a été réalisée par Damien Habrant, InCellArt (Nantes). La synthèse de certains lipides utilisés a été décrite dans des études précédentes : DOSP (Mével et al., 2012), DODT, DOAT, DOST, DOSST, DSST, DPST, DMST (Habrant et al., 2016), MMe2-14 et MMe3-87 (Mével et al., 2016). La synthèse du colipide MM27 a été décrite dans la publication suivante (Mével et al., 2008). Le colipide DOPE provient d'Avanti Polar Lipids.

Les solutions micellaires ont été obtenues en dissolvant le lipide cationique dans de l'eau ultrapure et en soniquant la suspension pendant 10 minutes dans un bain de sonication. La solution ainsi obtenue peut être utilisée pour formuler les complexes lipides/protéines.

### B. Formulation des complexes lipides/protéine

La protéine utilisée dans cette étude est l'anticorps monoclonal de souris anti-cytokératine 8 dirigé contre la région C terminal conjugué à la fluorescéine (anti-K8) ([SB37b], Abcam). Pour formuler les complexes lipides/protéines, l'anticorps a été dilué dans du milieu OptiMEM (Life Technologies) à une concentration finale de 0,8µg/ml (Figure 30). Les lipides ont également été dilués dans l'OptiMEM à un ratio molaire lipide/protéine de 1500 et a été ajouté à la solution de protéine (volume : volume).



**Figure 30 : Schéma représentant la préparation des complexes lipides cationiques/anticorps**

Le lipide cationique est mis en contact avec l'anticorps fluorescent (0,8 µg de protéine) à un ratio molaire de 1500. On obtient un produit final sous la forme d'un complexe lipide/protéine qui sera ensuite incubé sur des cellules.

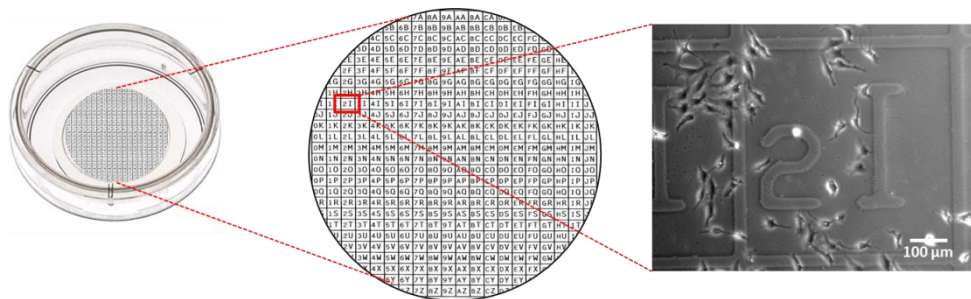
La solution finale a été mélangée doucement et incubée pendant 30 minutes à température ambiante pour permettre la complexation des lipides et des protéines avant d'être incubée sur les cellules.

### C. Culture cellulaire

Les cellules HeLa (adénocarcinome cervical, *H.sapiens*) ont été cultivées dans le milieu Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies). Les cellules HeLa exprimant les variants de CFTR, fournies par A. Edelman, ont été cultivées dans le milieu DMEM supplémenté avec 450µg/ml de zéocine (Life Technologies) pour maintenir la pression de sélection. Tous les milieux ont été supplémentés avec 2 mmol/l de L-Glutamine, 10µg/ml de streptomycine, 1000U/ml de pénicilline et 10% de sérum de veau fœtal (Life Technologies). Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub>.

### D. Délivrance intracellulaire de la protéine

Pour les expériences de cinétique et de microscopie corrélative, les cellules ont étéensemencées sur des matTek (MatTek Corporation), support avec des repères (Figure 31) afin de pouvoir suivre la même cellule en microscopie à épifluorescence et en microscopie électronique. Deux jours avant la délivrance de la protéine, les cellules ont étéensemencées à une densité de 20 000 cellules/matTek dans 2 ml de milieu complet.



**Figure 31 : Structure d'une matTek**

Ce type de support est utilisé en culture cellulaire. Les lamelles de verre quadrillées avec un motif alphanumérique unique dans chaque carré et idéales pour relocaliser des cellules en microscopie corrélative.

Pour chaque matTek, le milieu est remplacé par 2 ml d'optiMEM, 30 minutes avant la transfection. L'internalisation a été réalisée en déposant sur les cellules 250 µl de suspension de complexes lipides/protéines dans 1,750 ml d'optiMEM. La cinétique de la délivrance des

portéines a été suivie sur des cellules vivantes pendant 6 heures par microscopie à fluorescence en utilisant un Leica DMI6000B équipé d'une caméra CCD. Pour les expériences de microscopie corrélative, après 4 heures d'incubation à 37°C – 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules ont été lavées avec du PBS puis traitées pour la microscopie corrélative (Figure 32).

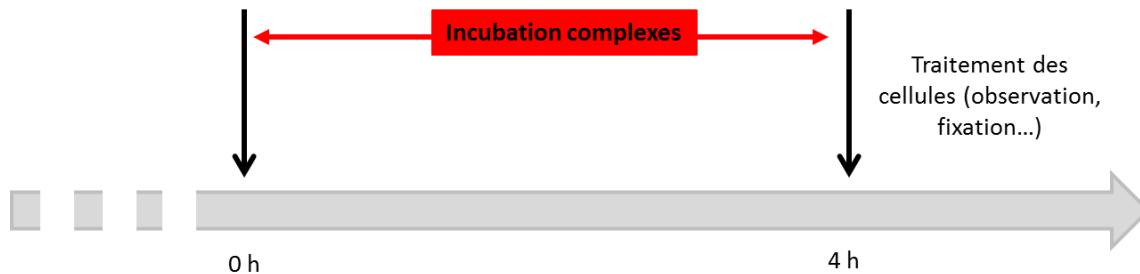


Figure 32 : Protocole de délivrance intracellulaire de l'anticorps fluorescent

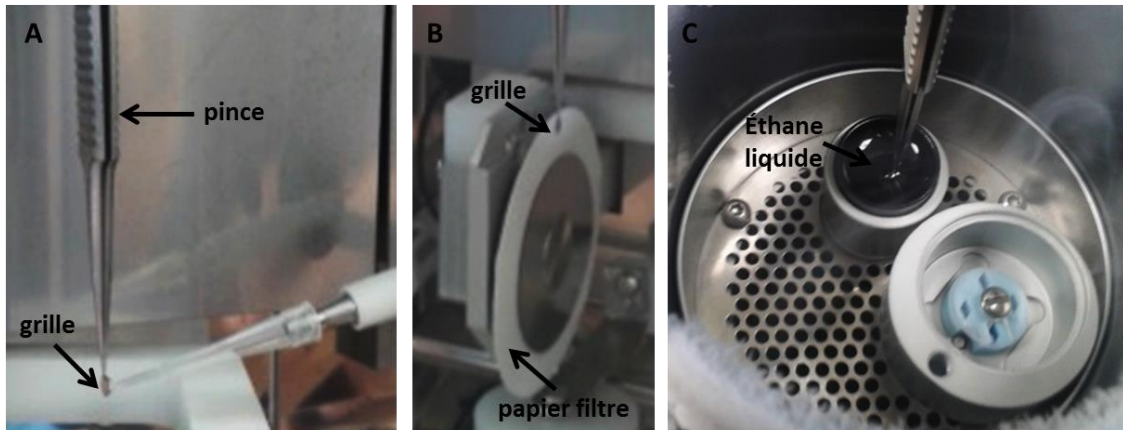
### E. Coloration négative

Après formation du complexe lipides/protéine comme décrit précédemment, 6  $\mu$ l d'échantillon ont été placés sur une grille recouverte de carbone (300 mesh) pendant 2 minutes à température ambiante après une procédure standard d'effluage (2mA, 0.3mBar, 40 secondes) pour rendre les grilles hydrophiles. Après absorption, l'excès a été enlevé avec du papier filtre (Whatman grade 5). Les grilles ont été rincées rapidement avec 6  $\mu$ l d'eau milliQ puis absorbées avec du papier filtre (Whatman grade 5). Ensuite, les échantillons ont été colorés pendant 2 minutes avec 6  $\mu$ l d'acétate d'uranyl à 2% à température ambiante. L'acétate d'uranyl a été enlevé en absorbant avec du papier filtre (Whatman grade 5) et les grilles ont été laissées sécher à l'air libre. Pour la détection de l'anti-K8, les échantillons sont incubés avec la protéine A couplée à des particules d'or colloïdal de 5nm de diamètre (UMC Utrecht) (1/50) pendant 15 minutes. Les échantillons ont été observés au microscope électronique à transmission (TEM, CM120, FEI) et les images ont été acquises en utilisant une caméra digitale 2k X 2k Gatan. Toutes les observations ont été faites à un grossissement compris entre x8 000 et x35 000.

### F. Cryo-microscopie électronique à transmission

Les complexes ont été formulés dans 120mM de NaCl et 20mM d'HEPES à pH 7,4 ou d'OptiMEM. Une goutte de 5  $\mu$ l d'échantillon a été déposée sur une grille côté carbone après une procédure standard d'effluage. L'excès a été enlevé avec du papier filtre et la grille a

été plongée dans un bain d'éthane liquide qui a été refroidi par l'azote liquide (Leica EMGP) (Figure 33). Les échantillons ont été observés à une température de  $-170^{\circ}\text{C}$  en utilisant un porte-objet (Gatan) adapté à la cryo-microscopie électronique à transmission avec un microscope électronique (FEI Tecnai F20) opérant à 200kV. Les images enregistrées avec une caméra CCD SlowScan (Gatan, 2k X 2k) ont été observées à un grossissement de x29 000 et de x50 000 en mode low-dose.



**Figure 33 : Images représentant les étapes de congélation pour la cryo-TEM**

(A) Dépôt de l'échantillon sur la grille côté carbone (B) Enlèvement de l'excès d'échantillon avec un papier filtre (C) Congélation de l'échantillon dans de l'éthane liquide

## G. Microscopie corrélative

L'internalisation et le trafic de l'anticorps anti-K8 ont été visualisés directement après 4 heures de délivrance intracellulaire. Les cellules ont été rincées avec du PBS et fixé avec une solution contenant 4 % de paraformaldéhyde et 0,1% de glutaraldéhyde pendant 30 minutes à température ambiante. Les matTeks ont été visualisés avec un microscope à épifluorescence (Leica DM600MB).

Dans le but de confirmer que l'anticorps anti-K8 se fixe sur sa cible : les filaments intermédiaires, la protéine a été délivrée dans les cellules comme précédemment puis après la fixation, elles ont été marquées avec un anticorps secondaire lapin anti-souris possédant deux marqueurs : AlexaFluor 594 et Nanogold de 1,4 nm appelé Fluoronanogold (FNG-A594-Au, NanoProbes) (Figure 34).

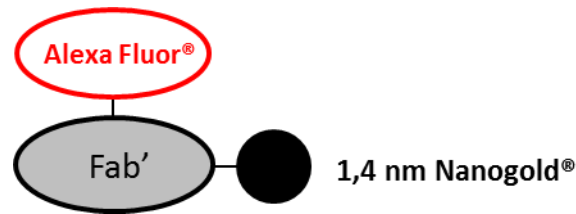


Figure 34 : Structure du fluoronanogold

En bref, les cellules ont été fixées comme précédemment et perméabilisées avec une solution de saponine à 0,1% pendant 3 minutes. Les cellules ont été rincées avec du PBS puis incubées avec FNG A594-Au (1 :1000) dans 0,2% de BSA délipidée (Bovine Saline Albumine) pendant 1 heure. Les cellules ont été ensuite observées au microscope à épifluorescence (Figure 35).

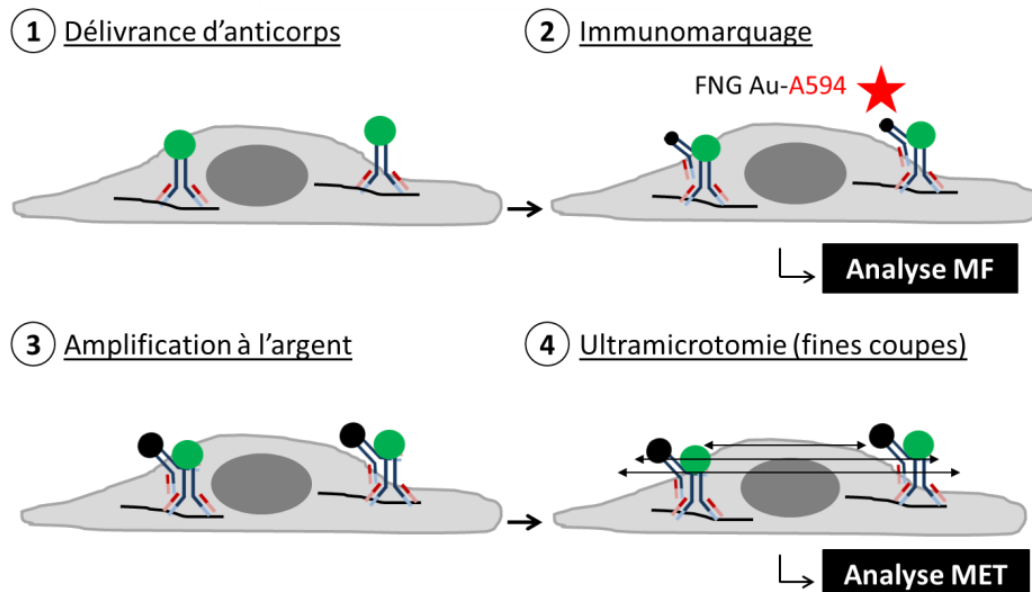


Figure 35 : Etapes de la microscopie corrélative

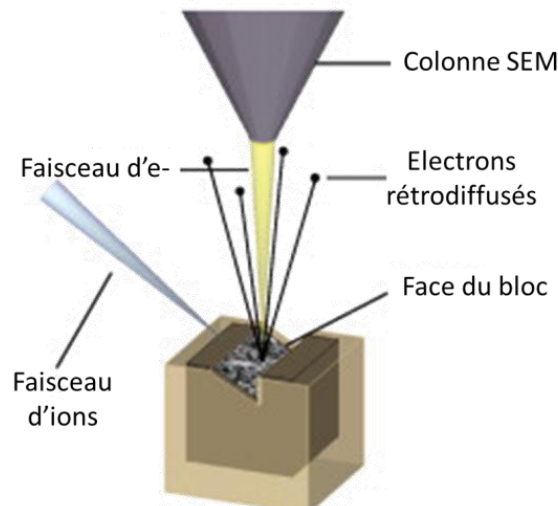
Une fois l'anticorps anti-cytokératine 8 délivré dans les cellules (1), un immunomarquage (2) est réalisé avec le FNG Au-A594. A cette étape, les cellules sont analysées en microscopie à épifluorescence. A l'aide des repères des matTeks, les cellules ayant internalisées l'anticorps sont localisées. Ensuite, les échantillons sont préparés pour la microscopie corrélative. Après fixation, le nanogold est amplifié à l'argent (3). Les échantillons sont ensuite déshydratés et inclus dans de la résine afin de réaliser de fines sections à l'aide d'un ultramicrotome (4). Les coupes sont enfin contrastées et analysées en MET.

Les cellules ont été préparées comme précédemment avec le FNG-A594-Au. Afin de visualiser les billes d'or présentes sur l'anticorps secondaire, le nanogold a été amplifié en utilisant un kit d'amplification à l'argent (HQ Sylver Enhancement kit, Nanoprobes). Elles ont

été ensuite post-fixées en utilisant 1% (v/v) de tétroxyde d'osmium pendant 10 minutes et déshydraté dans des solutions d'éthanol croissantes. Les cellules ont été imprégnées dans des solutions de résines croissantes diluées dans l'éthanol jusqu'à une solution pure de résine incubée toute la nuit (LX-112 Kit Epon). Le lendemain, les échantillons ont été inclus et polymérisés à 60°C pendant 48 heures. De fines coupes (50nm) ont été faites à l'aide d'un ultramicrotome (Leica SP5) et collectées sur des grilles slot recouvertes d'un film de butvar. Ensuite, les coupes ont été contrastées avec une solution d'acétate d'uranyle à 2% (v/v) pendant 30 minutes et ensuite avec une solution de citrate de plomb pendant 2 minutes. Les grilles ont été observées au microscope électronique à transmission (TEM, CM120, FEI) et les images ont été acquises en utilisant une caméra digitale 2k X 2k Gatan. Les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ et Gimp.

## **H. Microscopie électronique à balayage avec sonde ionique focalisée (FIB-SEM)**

Pour le FIB-SEM, les échantillons inclus en résine ont alors été montés sur un support en aluminium et recouvert d'environ 8nm de platine (Quorum Q150T ES). L'imagerie par microscopie électronique à faisceau d'ions focalisés a été réalisée en utilisant un système Zeiss Auriga Crossbeam avec le logiciel Atlas3D. Le faisceau d'ions focalisé a été réglé pour enlever des sections de 10nm en propulsant des ions de gallium à la surface (Figure 36). L'imagerie a été effectuée à 1,5kV en utilisant un détecteur ESB (électron rétrodiffusé). La reconstruction tridimensionnelle et la segmentation ont été générées à partir des piles d'images à l'aide des logiciels ImageJ Fiji et Chimera. Une segmentation automatique du volume de FIB-SEM avec 3D Hough Spherical Transform (script ImageJ labial) a été effectuée pour compter les particules à haute densité pour estimer le nombre de billes d'or.



**Figure 36 : Principe du FIB-SEM (Briggman and Bock, 2012)**

Le faisceau ionique focalisé est utilisé pour couper le bloc en tranches. La surface est exposée à un faisceau d'électrons et imagés.

## I. Test de viabilité cellulaire

Afin d'évaluer la viabilité cellulaire en présence des inhibiteurs des voies d'endocytose, le kit du test de viabilité cellulaire CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega) a été utilisé en accord avec le fabricant. Les cellules ont étéensemencées sur une plaque de 96 puits à une densité de 1000 cellules/puits et exposés aux inhibiteurs pendant 4 heures avec les complexes lipides/protéines. Une gamme de concentrations d'inhibiteurs a été réalisée pour déterminer la concentration optimale d'utilisation. Les résultats ont été exprimés par un indice de viabilité représenté par le pourcentage relatif comparé aux contrôles. La luminescence a été mesurée avec un lecteur de plaque (Triad LT, Dynex).

## J. Inhibition des voies d'endocytose

Dans le but de déterminer la voie d'entrée des complexes lipides/protéines, les cellules ont été incubées en présence des inhibiteurs des voies d'endocytoses (Amiloride à 50nM, Sigma A3085 ; Génistéine à 150µM, MERCK 345834 ; Chlorpromazine à 15µM, MERCK 215921). Après pré-incubation pendant 30 minutes avec l'un des inhibiteurs des voies d'endocytose, le milieu optiMEM a été remplacé et les complexes lipides/protéines ont été incubés pendant 4 heures en présence des inhibiteurs (Figure 37).

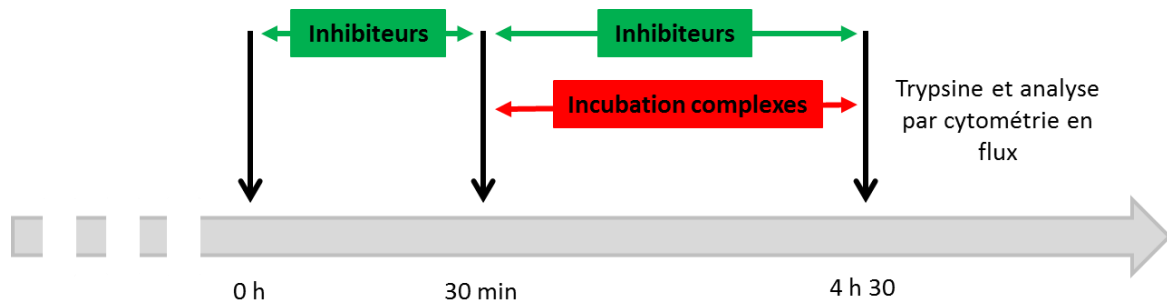


Figure 37 : Protocole de la délivrance intracellulaire de l'anticorps en présence d'inhibiteurs

### K. siRNA Cav-1

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 12 puits à raison de 2600 cellules par  $\text{cm}^2$ . Le jour suivant, les cellules ont été transfectées avec 10nM de siRNA Cavéoline-1 (Cav-1) (Stealth RNAi Cav1MSS273502, Invitrogen) grâce à l'utilisation de Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) dans du milieu OptiMEM Reduced I (Life Technologies) en suivant le protocole conseillé par Invitrogen. Un siRNA contrôle négatif (Stealth RNAi negative control duplexes, Invitrogen) a été utilisé dans les mêmes conditions. 24 heures ou 48 heures après la transfection, les cellules ont été analysées par Western blot, par cytométrie en flux ou par microscopie fluorescence (Figure 38).

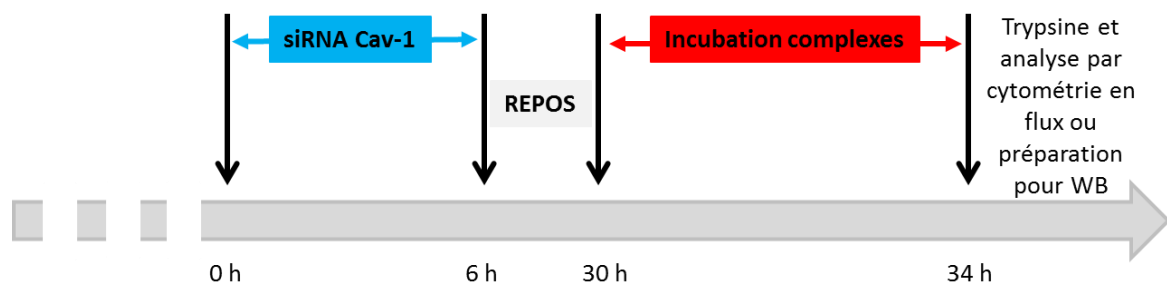


Figure 38 : Schéma du protocole de siRNA Cav-1

### L. Western blot

#### 1. Préparation extraits protéiques

Les cellules sont rincées au PBS (KCl 2,7mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,47mM, NaCl 137,9mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8mM,  $\text{CaCl}_2$  0,9mM,  $\text{MgCl}_2$  0,5mM) à 4°C puis grattées dans du PBS. La suspension cellulaire est centrifugée à 600 x g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans 150  $\mu\text{L}$  de PBS additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (ROCHE) puis soniqué 5 fois 10 secondes à puissance 7 (Sonicateur MISONIX, Microson). Les protéines



sont dosées grâce au réactif de Bradford (Sigma®). Pour cela, 50 µL d'échantillon sont ajoutés à 1,5 mL de réactif de Bradford. Le mélange est incubé 10 minutes à l'abri de la lumière avant de mesurer l'absorbance à 595nm. La concentration en protéines est déterminée grâce à une gamme étalon faite à partir de sérum albumine bovine (2mg/ml) comme protéine de référence.

## 2. Electrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

La séparation électrophorétique des protéines a été réalisée en conditions dénaturantes selon la technique de Laemmli (Laemmli, 1970) sur des gels de polyacrylamide de 10%. Les échantillons sont préparés dans du tampon de charge composé de 0.05M Tris-HCl, pH 6.8 ; 1% SDS ; 0.01% Bromophénol blue ; 30% Glycérol et 2% β-mercaptoéthanol, puis chauffés à 90°C pendant 5 minutes. La migration des échantillons est réalisée à 20mA dans du tampon de migration (Tris-HCl 25mM pH 8.3, glycine 192mM, SDS 0.1%) pendant 1h30. Des marqueurs de masse moléculaire (Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards, Biorad®) sont ajoutés pour définir la masse moléculaire des différentes protéines présentes dans les échantillons.

## 3. Transfert des protéines

Les protéines séparées par électrophorèse sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Immobilon-P, MILLIPORE). La membrane est préalablement activée dans du méthanol puis rincée à l'eau distillée. La membrane et le gel sont ensuite équilibrés 5 minutes dans du tampon de transfert (Tris-HCl 20mM pH 8.3, glycine 154mM, SDS 0.08% et méthanol 20%). Le transfert des protéines est réalisé en milieu semi-sec (Electro-Blotter AMERSHAM) à une intensité de 0.8 mA/cm<sup>2</sup> pendant 35 minutes.

## 4. Détection immunologique des protéines

Suite à l'électrophorèse et au transfert des protéines, la membrane est saturée pendant 2 heures en présence de lait écrémé 5% (p/v) dans du TBS-T (Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 138mM, KCl 2.7mM et Tween 20 0,1% (v/v)). L'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-Cav-1 (Ab2910, Abcam) est ensuite incubé 2 heures sur la nuit à 4°C à une dilution de 1/250000 et réalisé dans du TBS-T contenant 1% de lait écrémé. La membrane est rincée trois fois 10 minutes au TBS-T avant incubation de l'anticorps secondaire anti-lapin

(Invitrogen) 1 heure à une dilution de 1/50000 et réalisées dans du TBS-T additionné de lait écrémé 1%. Trois nouveaux rinçages au TBS-T sont alors effectués avant révélation. L'anticorps secondaire, couplé à une peroxydase (Horse Radish Peroxidase), permet de révéler le complexe antigène-anticorps grâce au kit de détection « Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent » (GE Healthcare). Le signal est détecté grâce à une camera CCD (GeneGnome, Syngene®).

## M. Cytométrie en flux

Les cellules HeLa ont étéensemencées sur des plaques de 12 puits à une densité de 95 000 cellules/puits. Après 48 heures, les cellules ont été incubées pendant 4 heures avec les complexes lipides/protéines seuls ou en présence des inhibiteurs des voies d'endocytose. Après traitement et rinçage, les cellules ont été trypsinées et resuspendues dans une solution froide de BSA à 0,1%. Les échantillons ont été analysés avec un cytomètre (BD Biosciences FACS Canto). Les complexes ont été excités par un laser de 488nm. Les analyses ont été faites avec le logiciel Diva. Les débris cellulaires ont été exclus, basés sur les caractéristiques cellulaires (granulosité et tailles). Les résultats ont été exprimés comme étant le pourcentage de l'intensité moyenne de fluorescence. 10 000 cellules ont été analysées. Le même protocole a été réalisé lorsque les cellules ont été traitées avec le siRNA Cav-1.

## N. Immunofluorescence

### 1. Cav-1

Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques de culture à 24 puits (Nunc) à une densité de  $50 \times 10^3$  cellules/puits. Après transfection de la protéine, les cellules ont été fixées avec du paraformaldehyde à 4% (PFA) pendant 20 minutes et perméabilisées avec du PBS contenant 0,1% de TritonX100 pendant 5 minutes. Les cellules sont rincées trois fois puis bloquées avec du PBS contenant 1% de BSA pendant 30 minutes. L'anticorps de lapin anti-Cav-1 (Ab2910, Abcam) (1: 300) a été incubé pendant une nuit dans du PBS avec 0,2% de BSA. Les cellules ont été rincées trois fois avant l'addition d'anticorps anti-lapin conjugués à AlexaFluor 546 (dilution 1: 500) pendant 45 minutes. Après avoir été lavées, les cellules ont été placées dans un milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories). Les cellules ont été observées sur un microscope à épifluorescence en utilisant Leica DMI6000B.

## 2. CFTR et K8

Les cellules HeLa ainsi que les cellules HeLa exprimant le CFTR WT et muté (delF508) ont étéensemencés sur des plaques 24 puits à une densité de 50 000 cellules/puits. Les cellules ont été fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 3,7% pendant 15 minutes. La perméabilisation a été faite avec du PBS contenant 0,1% de triton X100 pour 15 minutes (PBS-T). Les cellules ont été ensuite incubées avec une solution de blocage (3% BSA dans PBS-T) pendant 20 minutes. L'immuno-détection du CFTR a été faite en utilisant l'anticorps p24-1 (R&D systems) à une dilution de 1/300 et la protéine K8 en utilisant l'anticorps de souris anti-K8 (Ab87010, Abcam) à une dilution de 1/100 dans la solution de blocage durant toute la nuit à 4°C. Les cellules ont été rincées 4 fois pendant 5 minutes avec PBS-T. Préalablement, l'anticorps anti-CFTR a été conjugué à l'AlexaFluor A594 avec le kit Zenon en accord avec le fabricant. Après 4 rinçages de 5 minutes chacun, le milieu de montage Vectashield a été utilisé pour monter les cellules sur lames de microscopie. Les lames ont été observées au microscope à épifluorescence (Leica DMI600MB).

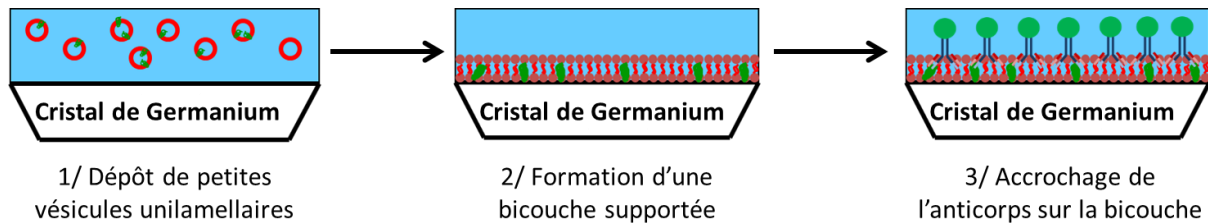
### **O. Préparation des lipides anioniques**

Les suspensions liposomales ont été obtenues en dissolvant le lipide DOPS et le lipide DOPC dans du chloroforme à un ratio 1:1. Après évaporation des solvants à l'évaporateur rotatif, les films lipidiques contenus ont été réhydratés dans une solution tampon contenant du NaCl-HCl à 20mM. Avant utilisation, les lipides anioniques ont été soniqués 3 fois 10 secondes à puissance 10 (Sonicateur MISONIX, Microson).

### **P. Spectroscopie IRTF en mode ATR**

Afin d'avoir une meilleure compréhension de l'interaction entre le lipide DOPRI et la protéine, des mesures de spectroscopies IRTF en mode ATR ont été effectuées. 5 µl de chaque échantillon ont été déposés sur un cristal ATR de germanium (Specac, Orpington) et a été laissé évaporer à l'air ambiant. Le spectre ATR-FITR a été enregistré avec un spectromètre Nicolet Nexus 870 FTIR équipée avec un détecteur mercure cadmium telluride (ThermoFisher Scientific) avec une résolution spectrale de 4 cm<sup>-1</sup> et un remplissage d'un niveau zéro. 100 interférogrammes représentant un temps d'acquisition de 3,5 minutes ont été co-ajoutés. Après la formation de la bicouche supportée avec le lipide cationique DOPRI à 2mg/ml dans une solution tampon Tris HCl, pH 7,42, différentes conditions ont été

testées. Des solutions de pH acides (solution pH 5,1 et pH 3) pour mimer l'endosome, une solution à forte concentration de sels (solution NaCl 1M) ainsi que des lipides anioniques (DOPC:DOPS) ont été ajoutées une fois l'anticorps accroché sur la bicouche (Figure 39).



**Figure 39 : Schéma de la formation de la bicouche supportée en ATR-FTIR**

Les petites vésicules unilamellaires formées avec le lipide cationique sont déposées à la surface d'un cristal de germanium (1). Une fois, la bicouche supportée est formée à la surface du cristal (2), l'anticorps est déposé et s'accroche à la bicouche (3).

## Q. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées au moins trois fois sur des cultures cellulaires différentes. Pour chaque série expérimentale et pour chaque paramètre mesuré, la moyenne arithmétique des valeurs obtenues a été calculée. Chaque moyenne est accompagnée de sa erreur standard (ESM). La comparaison des moyennes des valeurs obtenues dans les différents groupes expérimentaux a été effectuée par un test "t" de Student non apparié. Une différence entre deux moyennes est considérée comme significative lorsqu'elle est associée à une probabilité  $p < 0,05$ .





## **Résultats**





**Chapitre 1 : Etude de l'influence du bras espaceur des vecteurs  
lipidiques dérivés d'aminoglycosides pour la délivrance d'acides  
nucléiques**

## Résultats

### Chapitre 1 : Etude de l'influence du bras espaceur des vecteurs lipidiques dérivés d'aminoglycosides pour la délivrance d'acides nucléiques

La structure des lipides cationiques utilisés dans le domaine de la délivrance d'acides nucléiques est divisée en trois parties : un groupe de tête chargé positivement, capable d'interagir de manière électrostatique avec les acides nucléiques, une queue hydrophobe pour permettre les interactions avec les membranes cellulaires et un bras espaceur qui relie la tête polaire et la queue hydrophobe. Chacun des composés peuvent être modifiés et il est possible de créer un grand nombre de vecteurs différents. Par exemple, au sein de la tête polaire, on peut retrouver les aminoglycosides. Les vecteurs dérivés des aminoglycosides sont des composés utilisés pour délivrer des molécules d'acides nucléiques (Belmont et al., 2002) car ils se lient naturellement aux structures tridimensionnelles de l'ARN (Hendrix et al., 1997). De nombreuses études ont utilisés des dérivés d'aminoglycosides tels que la paromomycine (Mével et al., 2012), la néomycine (Bera et al., 2010; Mével et al., 2012) et la kanamycine (Sainlos et al., 2005) afin de délivrer des acides nucléiques. A ce jour, aucune formulation universelle n'a été clairement identifiée, permettant la délivrance de toutes les molécules d'acides nucléiques (ADN, ARNm, siRNA). Dans la littérature, la majorité des formulations lipidiques décrites présentent un colipide neutre améliorant l'efficacité de transfection. Ce système est basé sur la formulation d'un lipide cationique avec un colipide neutre tel que DOPC (Hefesha et al., 2011) ou DOPE (Hattori et al., 2005). Le colipide DOPE est connu pour être un lipide fusogénique (Gao and Huang, 1995; Khalil et al., 2006) et donc permet un meilleur échappement endosomal par un mécanisme de fusion. En effet, il a été montré dans Felgner et al., en 1994 que le colipide neutre DOPE associé à un lipide cationique présenté une forte efficacité de transfection afin de délivrer de l'ADN au sein de cellules en culture. Afin d'optimiser le système synthétique de délivrance de gènes, différentes formulations ont été développées. De nouveaux colipides neutres (dérivés de l'histamine ou de l'histidine) ont été développés et semblent être 100 fois plus efficaces.

## Influence du bras espaceur des lipides cationiques

Dans cette étude, nous avons évalué différents paramètres des lipides ionisables (modification de la chaîne hydrophobe ou du bras espaceur) qui peuvent être impliqués dans l'échappement endosomal d'acides nucléiques (Figure 40).

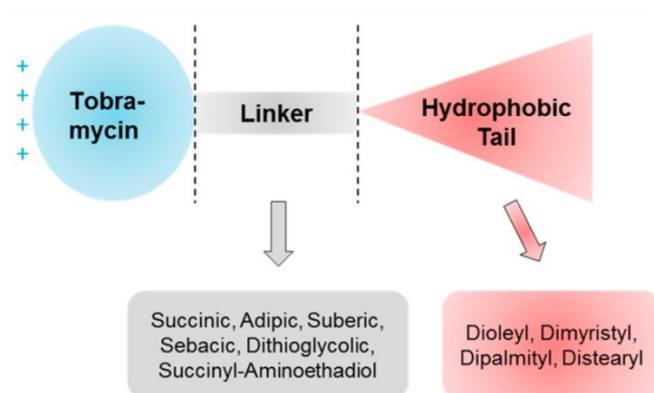


Figure 40 : Structures des lipides cationiques.

Tous les composés de l'étude possèdent une tête polaire tobramycine et une queue hydrophobe séparée par un bras espaceur qui a été modifié :

- modification de la longueur du bras espaceur
- utilisation d'un bras espaceurs sensibles à l'environnement

La molécule de référence est le composé **DOST** (composé 13 dans l'article), qui possède un bras espaceur **succinyl** et deux chaînes **oleyl** (Figure 41).

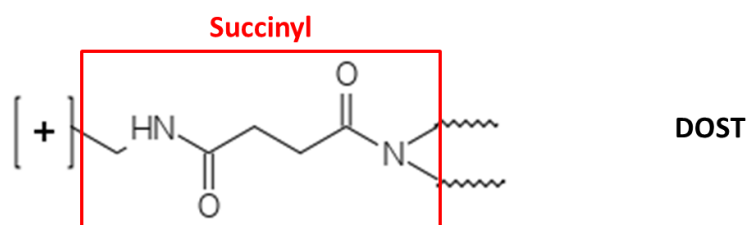


Figure 41 : Structure du lipide cationique DOST

Une série d'analogues de ce composé a été synthétisée en allongeant le bras espaceur d'origine (succinyl). Trois nouveaux analogues ont été synthétisés (Figure 42) : le composé **DOAT** (composé 24a) avec le bras espaceur adipyl, le composé **DOSUT** (composé 24b) possédant le groupement suberyl et le composé **DOSET** (composé 24c) ayant le groupe

sebacyl au niveau du bras espaceur. Une autre catégorie a été synthétisée en modifiant le bras espaceur pour contenir des fonctions biodégradables (pont disulfure ou diester). Deux molécules ont été préparées (Figure 42): le composé **DODT** (composé 24d) portant un pont disulfure et le composé **DOSST** (composé 30) portant une fonction diester.

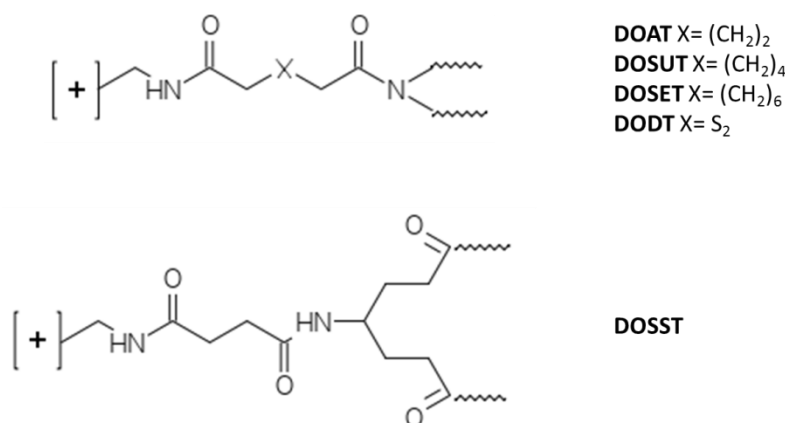


Figure 42 : Structures des lipides cationiques dérivés de DOST

Nous avons évalué l'efficacité de transfection de trois molécules d'acides nucléiques (ADN, siRNA et ARNm) sur une lignée cellulaire (cellules HeLa) mais aussi sur des cultures de cellules primaires (fibroblastes humains et cellules musculaires d'aorte de rat). Dans ces travaux, le changement de la longueur de la chaîne n'a pas permis d'améliorer l'efficacité de transfection par rapport au composé de référence. Ces composés ne sont pas décrits par la suite car ils n'ont pas fait l'objet d'étude par cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM). En effet, dans cette étude, j'ai caractérisé les composés les plus efficaces en cryo-TEM. La morphologie des complexes a été réalisée sur une sélection de composés : **DOST**, **DOSST** et **DOAT** avec les trois acides nucléiques. Ces résultats ont été appuyés et corréléés aux expériences d'efficacité de transfection.

#### Pour les molécules d'ARNm :

Les observations de cryo-TEM ont montré que **DOSST** forment de très petits complexes (70 nm) alors que **DOST** et **DOAT** forment des complexes allant de 200 à 500nm. Tous ces assemblages forment de petits globules de 20nm de diamètre. Pour tous les types cellulaires, il a été montré que **DOSST** a une plus haute efficacité de transfection que les autres composés. Seulement **DODT** ne transfecte pas les molécules d'acides nucléiques.

Pour les molécules d'ADN :

Il a été montré en cryo-TEM que **DOAT** forme de très larges complexes (> 1µm). En revanche, **DOST** et **DOSST** forment des complexes de 200-500nm. De petits globules d'environ 40nm apparaissent. Il a été montré que tous les composés sauf **DODT** ont une haute efficacité de transfection dans la lignée cellulaire. En revanche, dans les cultures de cellules primaires, seul **DOSST** conduit à une haute efficacité de transfection. **DOAT** a une efficacité de transfection similaire à **DOST**.

Pour les molécules de siRNA :

En cryo-TEM, on a pu observer que **DOST** et **DOAT** forment des complexes de différentes tailles allant de 80 à 150 nm alors que **DOSST** forme des complexes de taille homogène (100nm). Comme pour l'ARNm, ces complexes forment de petits globules de 20nm de diamètre. Quel que soit le type cellulaire, **DOAT** et **DOSST** ont présenté une très faible efficacité de transfection comparé à **DOST**. Seul **DODT** ne transfecte pas.

Formulation liposoaminoglycoside double :

Les comportements de **DOAT** et de **DOSST** ont été étudiés en mélangeant ces lipides avec un colipide neutre DOPE. La formulation micellaire de **DOAT** ne transfecte pas les molécules d'ADN. Lorsque **DOAT** est associé au colipide DOPE, on atteint le même niveau de transfection que **DOSST** en formulation micellaire. Pour **DOSST**, un niveau de transfection élevé est atteint que ce soit avec une formulation micellaire ou liposomale.

Conclusion : Il s'est avéré que le bras espaceur est une partie importante car on a obtenu une transfection très faible (**DOAT**) ou une forte transfection (**DOSST**) par rapport à la molécule de référence **DOST**. En effet, quel que soit le type cellulaire ou la molécule d'acides nucléiques, le pont disulfure (molécule **DOAT**) dans la structure des dérivés lipidiques de tobramycine est désavantageux pour l'efficacité de transfection. En revanche, **DOSST** (bras espaceur diester) a une meilleure capacité à se lier aux acides nucléiques notamment à l'ARNm. Ce composé forme de petits complexes avec les acides nucléiques. Il semble être un excellent candidat notamment pour la thérapie avec des ARNm.

**L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de la publication suivante dans la revue Journal of Medicinal Chemistry.**



## Design of Ionizable Lipids To Overcome the Limiting Step of Endosomal Escape: Application in the Intracellular Delivery of mRNA, DNA, and siRNA

Damien Habrant,<sup>†,‡</sup> Pauline Peuziat,<sup>‡,§,⊥</sup> Thibault Colombani,<sup>‡,§</sup> Laurence Dallet,<sup>||</sup> Johan Gehin,<sup>†</sup> Emilie Goudeau,<sup>†</sup> Bérangère Evrard,<sup>†</sup> Olivier Lambert,<sup>||</sup> Thomas Haudebourg,<sup>‡,§</sup> and Bruno Pitard<sup>\*,†,‡,§</sup>

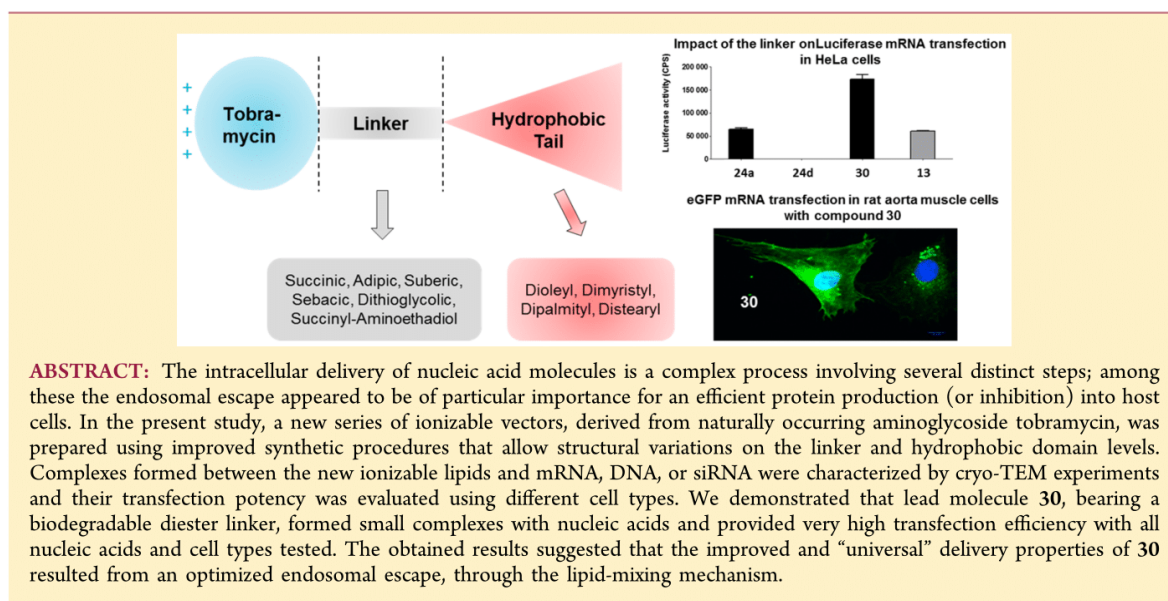
<sup>†</sup>In-Cell-Art, 21 rue de la Noue Bras de Fer, 44200 Nantes, France

<sup>‡</sup>Unité INSERM UMR1087, CNRS UMR 6291, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes, France

<sup>§</sup>Université de Nantes, L'institut du Thorax, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes, France

<sup>||</sup>CBMN UMR-CNRS 5248 IECB, Université de Bordeaux 1-IPB, Allée Geoffroy Saint Hilaire, Pessac F-33600, France

### Supporting Information



**ABSTRACT:** The intracellular delivery of nucleic acid molecules is a complex process involving several distinct steps; among these the endosomal escape appeared to be of particular importance for an efficient protein production (or inhibition) into host cells. In the present study, a new series of ionizable vectors, derived from naturally occurring aminoglycoside tobramycin, was prepared using improved synthetic procedures that allow structural variations on the linker and hydrophobic domain levels. Complexes formed between the new ionizable lipids and mRNA, DNA, or siRNA were characterized by cryo-TEM experiments and their transfection potency was evaluated using different cell types. We demonstrated that lead molecule 30, bearing a biodegradable diester linker, formed small complexes with nucleic acids and provided very high transfection efficiency with all nucleic acids and cell types tested. The obtained results suggested that the improved and “universal” delivery properties of 30 resulted from an optimized endosomal escape, through the lipid-mixing mechanism.

### INTRODUCTION

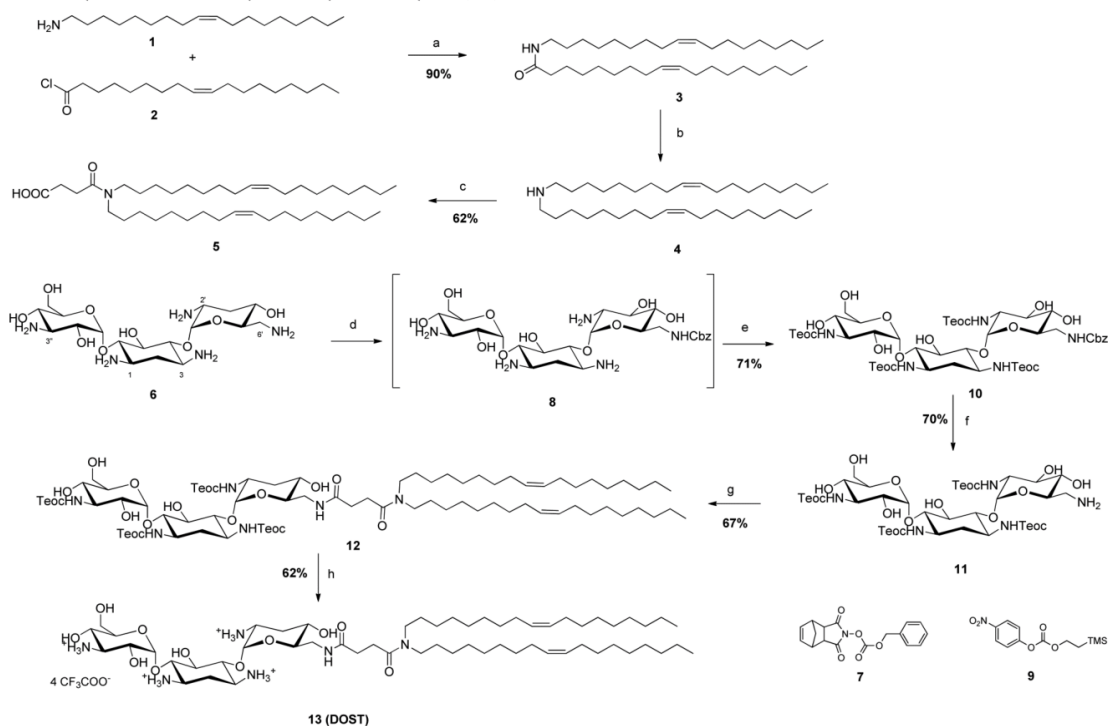
Messenger RNA (mRNA)-based drugs have recently emerged as a new promising therapeutic class to deliver genetic information.<sup>1,2</sup> Indeed, mRNA offers several advantages compared to long-studied plasmid DNA. Unlike DNA, mRNA has the characteristic of being translated directly in the cytoplasm and being fully metabolized. Moreover, there is no risk of genome integration for mRNA, which represents one of the main drawbacks of DNA-based therapeutics. For these reasons, there is currently a growing interest in mRNA and its potential applications for humans. Therapeutic approaches involving RNA interference (RNAi) are also actively investigated.<sup>3,4</sup> RNAi is a post-transcriptional process triggered by the introduction of small-interfering RNA (siRNA), which leads to gene silencing in a sequence-specific manner.

As unformulated nucleic acids do not promote sufficient levels of gene expression (or inhibition in the case of siRNA), a critical

issue for the efficient application of gene therapy to human diseases are the vectors used to improve the delivery of nucleic acids into host cells.<sup>5–7</sup> Viral vectors have proven their high efficiency in DNA transfer; however, they can lead to undesired immunological responses and are still limited for the delivery of more specific nucleic acids such as mRNA or siRNA.<sup>8–11</sup> These observations have led to the development of nonviral synthetic vectors. Within the difference classes of nonviral vectors, several structure–activity relationships (SARs) have been performed in order to improve the ability of cationic amphiphilic molecules to formulate and deliver nucleic acids.<sup>12–19</sup> However, due to the complex process of delivery, no universal structural feature has been clearly identified, and the majority of ionizable lipids described in the literature require the presence of a helper

**Received:** October 28, 2015

**Published:** March 4, 2016

**Scheme 1. Synthesis of Di-oleyl-succinyl-tobramycin (13)<sup>a</sup>**


<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) Et<sub>3</sub>N, DCM, 20 h, rt; (b) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 12 h, 55 °C; (c) succinic anhydride, Et<sub>3</sub>N, DCM, 12 h, rt; (d) 7, Et<sub>3</sub>N, DMF, H<sub>2</sub>O, 24 h, rt; (e) 8, Et<sub>3</sub>N, DMF, 48 h, 55 °C; (f) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, MeOH, H<sub>2</sub>O, 12 h, rt; (g) 5, HBTU, DMAP, DMF, 12 h, rt; (h) TFA, DCM, 2 h, rt.

fusogenic lipid to achieve efficient transfection efficiency via liposomal formulations.

The accepted mechanism for the intracellular delivery of nucleic acids mediated by ionizable lipids consists in several distinct steps: formation of the lipoplex, binding to the cell membrane, endocytosis, destabilization of the endosomal membrane, and release of the nucleic acid. The endosomal escape pathway for improved delivery of genetic information has been recently investigated, but only few reports mention ionizable lipids.<sup>20–23</sup> The recent study from Zerial and co-workers concluded that the endosomal escape “provides the major opportunity to improve the delivery system.”<sup>22</sup>

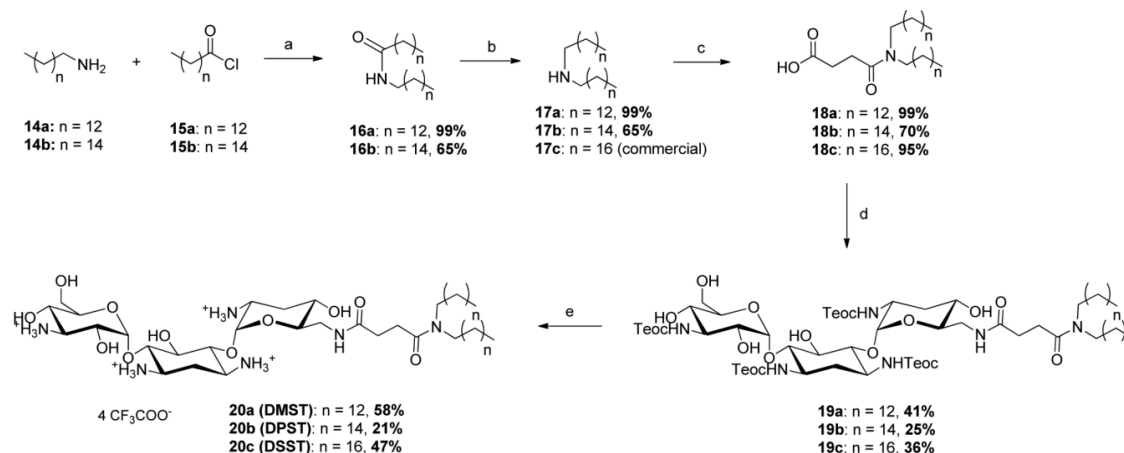
The endosomal escape step has been described to be mediated by the ionizable lipids used as delivery vehicles.<sup>24,25</sup> Indeed, when lipoplexes composed of ionizable lipids and nucleic acids interact with the endosomal membranes, the anionic phospholipids (usually located on the cytoplasmic-facing monolayer of the membrane) flip toward the inside of the endosome, causing the destabilization of the membrane. Neutral ion pairs between the positively charged lipids used as delivery vehicle and the negatively charged phospholipids of the membrane are then formed. This “lipid mixing” mechanism leads to the formation of new multilamellar lipid structures and thus to the disruption of the integrity of the endosomal membrane. Cryo-TEM experiments have demonstrated that the structures of the newly formed lipidic assemblies are highly dependent on the nature of the ionizable lipids.<sup>26</sup> After this step, nucleic acid molecules are present in the cytosol without being surrounded by a closed endosomal membrane and are able to diffuse. The interactions

between the ionizable lipids and the anionic phospholipids are therefore of crucial importance to drive the efficient release of the nucleic acids.

If different in their mechanism of action, the different classes of nucleic acids mRNA, DNA, and siRNA share some common features concerning their delivery mechanism. Thus, identifying and overcoming common limiting step(s) may help for the design of universal delivery vehicles. In this purpose, we decided to prepare various ionizable lipids based on the aminoglycoside tobramycin, which was used as a model of a 4,6-disubstituted 2-deoxystreptamine derivatives. Aminoglycosides are natural products able to provide a versatile polycationic framework because several amino groups are present in their structure (together with numerous hydroxyl functions). The family of aminoglycoside derivatives already showed promising results for the delivery of plasmid DNA and siRNA.<sup>27–31</sup> Interestingly aminoglycosides are also known to be natural binders to three-dimensional RNA structures, which make them of particular interest for the development of mRNA therapeutics.<sup>32,33</sup>

Despite of being promising candidates for nucleic acids delivery, this family still lacks a SAR study to elucidate the key structural features required to provide improved transfection efficiency through facilitated endosomal escape. Using a rational approach, our objective was to discover simple and versatile ionizable lipids, able to reach high levels of transfection without the need of a helper lipid. We herein report on the synthesis and the characterization of a new series of lipidic aminoglycoside derivatives and their corresponding transfection efficiency in



**Scheme 2. Synthesis of Di-myristyl-succinyl-tobramycin (20a), Di-palmityl-succinyl-tobramycin (20b), and Di-stearyl-succinyl-tobramycin (20c)<sup>a</sup>**


<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) Et<sub>3</sub>N, THF, 20 h, rt; (b) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 12 h, 55 °C; (c) succinic anhydride, Et<sub>3</sub>N, DCM, 12 h, rt; (d) **11**, HBTU, DMAP, DMF, 12 h, rt; (e) TFA, DCM, 2 h, rt.

different cell types using three distinct types of nucleic acids: mRNA, DNA, and siRNA.

## RESULTS

### Synthesis of Aminoglycoside-Derived Ionizable Lipids.

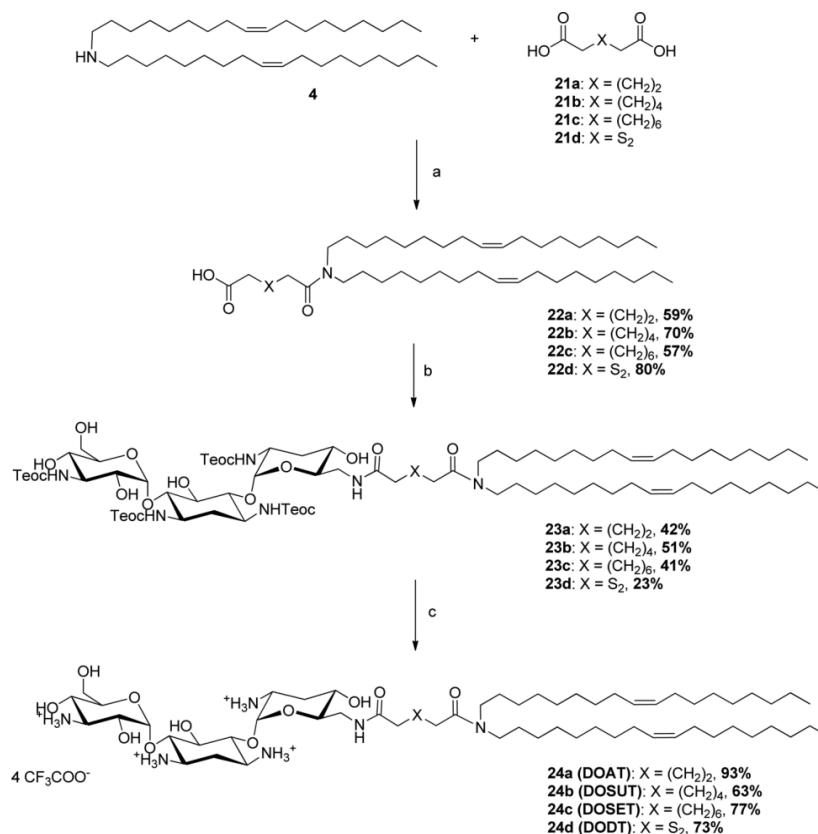
Ionizable lipids are amphiphilic molecules, commonly composed of three distinct parts: an ionizable headgroup, a linker (also called spacer), and a lipophilic moiety. They interact with nucleic acids, forming condensed aggregates named lipoplexes.<sup>34</sup> In the present study, we aimed at assessing different parameters that may be involved in the lipid mixing mechanism and therefore in the nucleic acid delivery: (1) the optimal configuration of the hydrophobic domain (length, insaturation), (2) the importance of the distance between the ionizable headgroup and the lipophilic domain (by changing the length of the linker), and (3) the behavior of environment-sensitive linkers, supposed to be perturbed after reaching the intracellular compartment (reduced pH, presence of enzymes, and reducing agents). The last category is of particular interest because the presence of biodegradable functions in the linker was described to be associated with higher transfection efficiency and with decreased toxicity compared to “classical” linkers.<sup>35–39</sup>

The starting point of our SAR was the molecule **13** (DOST for di-oleyl-succinyl-tobramycin), which is composed of a succinyl linker and two oleyl chains as hydrophobic moiety.<sup>31</sup> The general strategy for the preparation of **13** followed the synthetic route already described for this type of compound (Scheme 1).<sup>27–31</sup> The linker-hydrophobic tail was prepared in three simple steps. First, oleylamine **1** and oleoyl chloride **2** were coupled to form amide **3**, which was then reduced by LiAlH<sub>4</sub> to dioleylamine **4**. Then, addition of succinic anhydride furnished the “DOS” moiety **5** in good yield. Concerning the aminoglycoside part, the described strategy employing orthogonal protecting groups was applied. Starting with tobramycin, selective Cbz-protection of the primary amine on the 6'-position was achieved using bulky acylating agent *N*-benzyloxycarbonyloxy-5-norbornene-2,3-dicarboximide (Nor-Cbz **7**).<sup>40</sup> The four remaining secondary amines of **8** (positions 1, 3, 2', and 3'') were then protected with a Teoc group by 2-(trimethylsilyl)ethyl *p*-nitrophenylcarbonate

(Teoc-ONp **9**). As an improvement to the described procedure, we were able to perform these consecutive protection steps in a single pot: tobramycin was first dissolved in H<sub>2</sub>O/Et<sub>3</sub>N mixture before addition of Nor-Cbz in DMF. After 24 h, a solution of Teoc-ONp in DMF was added, and the mixture stirred for 48 h at 55 °C. This sequential addition of protecting groups allowed for the preparation of fully protected tobramycin derivative **10** in a single step and with a good 71% yield. Catalytic hydrogenation of **10** allowed for the deprotection of the Cbz group and the liberation of the primary amine to give **11**. Then, peptide-like coupling between carboxylic acid **5** and amine **11** was performed using HBTU and DMAP in DMF to produce the protected compound **12**. Finally, **12** was treated by TFA in DCM, which allowed for the isolation of the final compound **13** as a TFA salt.

A series of new analogues derived from **13** was then synthesized. For their preparation, these molecules used the common intermediate **11**, but the linker-hydrophobic tail conjugate was different. As described in the introduction, the first parameters we wanted to assess were the influence of the double bond in the lipophilic chains and the length of the chains themselves. In this context, we prepared different symmetrical dialkyl amines, inspired by the synthesis of scaffold **5** (Scheme 2). Myristylamine **14a** and palmitylamine **14b**, respectively, reacted with myristoyl chloride **15a** and palmitoyl chloride **15b** to give amides **16a** and **16b**, respectively, which were then reduced with LiAlH<sub>4</sub> to the corresponding symmetrical amines **17a** and **17b**. The linker part was introduced by reaction of these amines, as well as commercially available distearylamine **17c**, with succinic anhydride to give the conjugates **18a–c** in overall good yields. As previously described, these carboxylic acids were coupled with the tobramycin amino derivative **11**, before removal of the Teoc groups by TFA. This sequence allowed for the preparation of three new molecules: **20a** (DMST for di-myristyl-succinyl-tobramycin), **20b** (DPST for di-palmityl-succinyl-tobramycin), and **20c** (DSST for di-stearyl-succinyl-tobramycin).

Next, we wanted to assess the influence of the linker on the transfection efficiency. In this purpose, two types of linkers were considered: the first type was a linker that was simply elongated,

Scheme 3. Synthesis of Di-oleyl-adipyl-tobramycin (24a), Di-oleyl-suberyl-tobramycin (24b), Di-oleyl-sebacyl-tobramycin (24c), and Di-oleyl-dithioglycolyl-tobramycin (24d)<sup>a</sup>


<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) EDC, DMAP, THF, 12 h, rt; (b) **11**, HBTU, DMAP, DMF, 12 h, rt; (c) TFA, DCM, 2 h, rt.

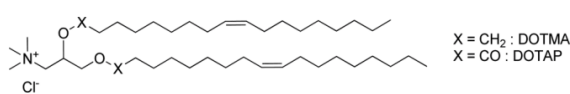
by introducing supplementary methylene units compared to the original succinyl linker, and for the second type, the linker was modified to contain biodegradable functions (disulfide bridge or diester).

In this context, dioleylamine **4** reacted with different dicarboxylic acids (adipic **21a**, suberic **21b**, sebacic **21c**, and dithioglycolic **21d** acids), in the presence of EDC/DMAP to give the corresponding conjugates **22a–d**, in moderate yields (Scheme 3). Similarly, these conjugates were coupled with amine **11**, and after, Teoc-removal gave four new analogues: **24a** (DOAT for di-oleyl-adipyl-tobramycin), **24b** (DOSUT for di-oleyl-suberyl-tobramycin), **24c** (DOSET for di-oleyl-sebacyl-tobramycin), and **24d** (DODT for di-oleyl-dithioglycolyl-tobramycin).

The two most hydrophobic ionizable lipids **24b** and **24c** could not be assessed in the transfection experiments, due to solubility issues in water (unlike the other molecules, we observed for these two compounds a visible precipitate when water was added). Despite being bad news for our structure–activity relationship study, this indicates that too lipophilic compounds cannot be used as efficient nanocarriers for nucleic acids in our tested conditions.

Lastly, the compound **30** (DOSST for di-oleyl-succinyl-serinyl-tobramycin) bearing a diester function was prepared (Scheme 4). This molecule was inspired by the structure of

Scheme 4. Structures of DOTMA and DOTAP

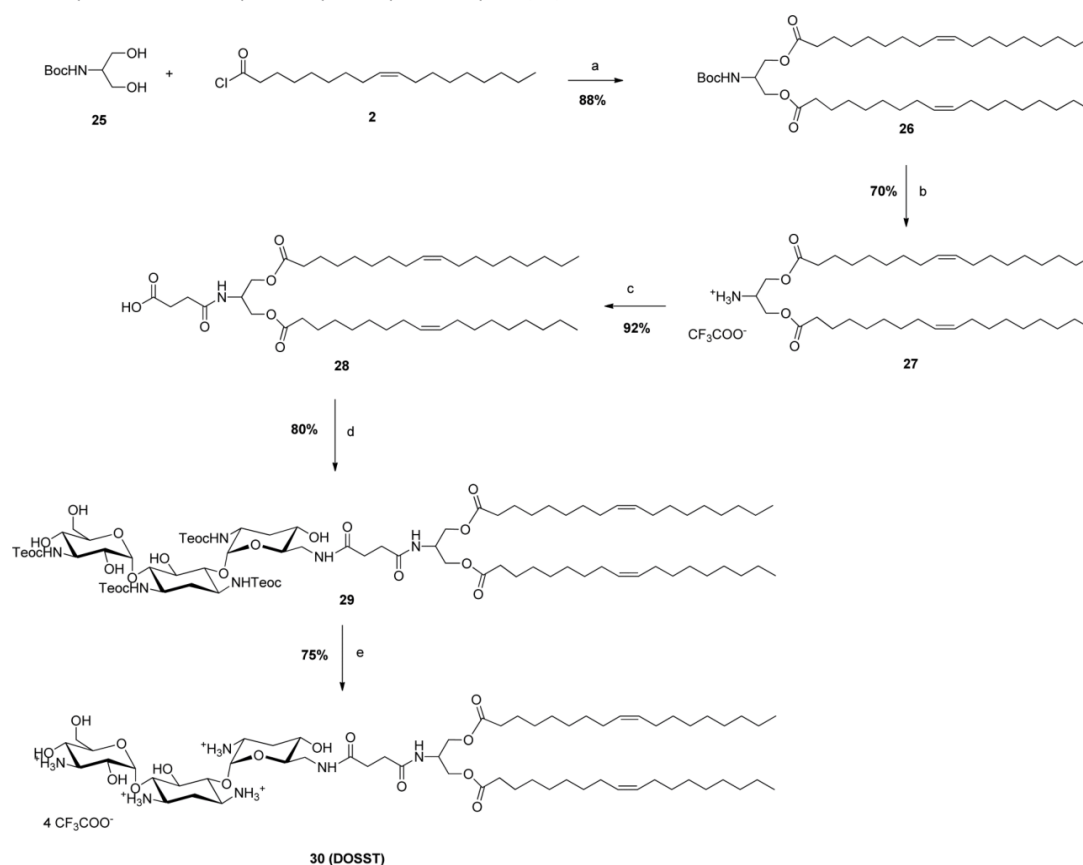


DOTAP, a well-studied commercial cationic lipid, known as the diester equivalent of DOTMA.<sup>41,42</sup>

The synthesis started with *N*-Boc serinol **25**, which was diacylated with oleoyl chloride to give **26**. After TFA treatment and reaction with succinic anhydride, the conjugate **28** was obtained. Similarly, the carboxylic acid function of **28** reacted with the amino group of **11** and gave access to the final compound **30** after removal of the protecting groups.

With these molecules in hand, experiments were carried out to study whether the chemical structure of the linker and/or the hydrophobic tail had an impact on the transfection efficiency of different classes of nucleic acids.

**Transfection Efficiency Evaluation.** Many transfection reagents have been described to lead to effective gene transfer in cell lines, but their transfection potencies are still limited in mammalian primary cells. Yet, transfecting primary cells is a major concern as these cells are biologically more relevant and mimic *in vivo* situation with better accuracy. In this context, we decided to evaluate the transfection efficiency not only on HeLa

Scheme 5. Synthesis of Di-oleyl-succinyl-serinyl-tobramycin (30)<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) pyridine,  $\text{CHCl}_3$ , 12 h, rt; (b) TFA, DCM, 2 h, rt; (c) succinic anhydride,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DCM, 12 h, rt; (d) **11**, HBTU, DMAP, DMF, 12 h, rt; (e) TFA, DCM, 2 h, rt.

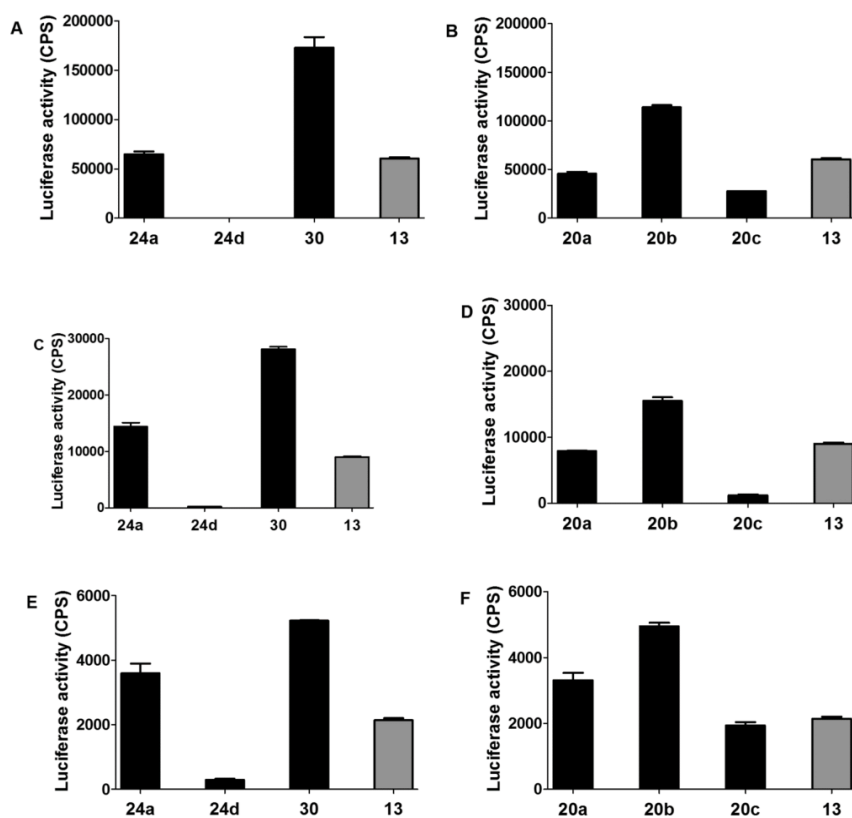
cell lines but also on two types of primary cells: rat aorta muscle and human fibroblasts cells.

First, we evaluated the efficiency of the tobramycin lipidic derivatives for the mRNA transfection (Figure 1). In this first set of experiments, we observed that all cell types displayed a similar trend where three compounds provided better transfection efficiency compared to the reference compound **13**. Results indeed showed that the formulation with **30** containing a diester linker led to a much higher level of luciferase expression (2- to 3-fold) compared to **13**. Complexes of **24a**/mRNA (adipic linker) and **20b**/mRNA (palmityl derivative) also led to a slightly higher luciferase expression compared to **13**, on the three cell types. On the other hand, cells transfected with myristyl and stearyl compounds, **20a** and **20c**, showed lower expression than cells transfected with **13**, while compound **24d** with a disulfide bridge produced almost no luciferase signal in the tested conditions. These observations for **24d** were similar for the other nucleic acids. This suggests that the disulfide bridge in the structure of **24d** is detrimental for the transfection efficiency; the peculiar behavior of this compound will be discussed in a following section.

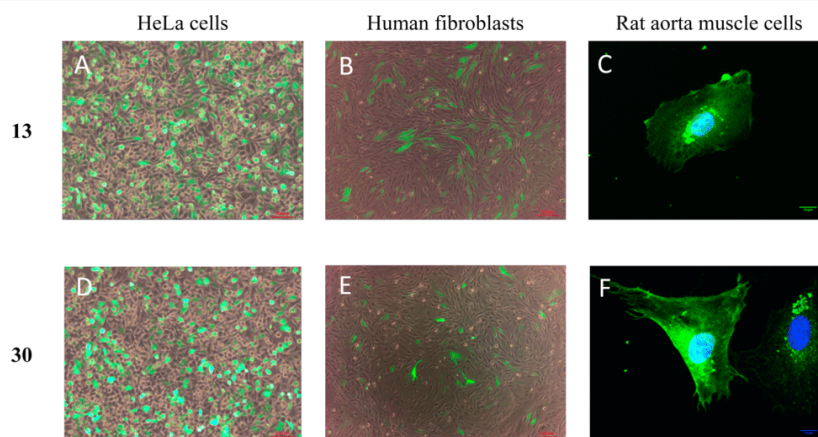
In addition, we formulated mRNA encoding eGFP with the reference lipid **13** and the best candidate for mRNA **30** to observe transfected cells by microscopy (Figure 2). HeLa cells

(Figure 2A,D) and human fibroblasts cells (Figure 2B,E) transfected with **13** or **30** showed approximately the same percentage of eGFP expressing cells (about 80% for HeLa and 30% for fibroblasts) and the same viability (about 90% in both cases). Thus, both **13** and **30** confirmed their high transfection efficiency, with a low toxicity. Interestingly, the observation at a higher magnification of rat aorta smooth muscle cells transfected with **30**/mRNA complexes showed higher expression of eGFP protein than cells transfected with **13**/mRNA complexes (Figure 2C,F). Compared to reference molecule **13**, compound **30** seems to have the capacity to bring more copies of mRNA inside the cells, which leads to higher expression levels.

After these results with mRNA, we performed experiments with two other types of nucleic acids, DNA and siRNA, to evaluate the versatile character of these new compounds. In this context, the transfection activities of lipoplexes formed by the formulation of plasmid DNA with either compound **13** or one of its derivatives were measured by a luciferase assay on different cell lines (Figure 3). For the cell line HeLa (Figure 3A,B), no significant difference was observed, as all molecules displayed high luciferase expression, with the exception of disulfide compound **24d**, where no luciferase was produced. However, the more-difficult-to-transfect aorta muscle cells and the human fibroblasts cells showed some differences between the molecules,



**Figure 1.** *In vitro* transfection of mRNA encoding luciferase in different cells. HeLa cells (A,B), rat aorta smooth muscle cells (C,D), and human fibroblasts cells (E,F) were transfected with 0.5  $\mu\text{g}$  of mRNA formulated with each ionizable lipid at a charge ratio of 5. Data represent mean  $\pm$  SEM luciferase activity in counts per second (CPS) 24 h post-transfection for each nanocarrier compared to 13 (gray).

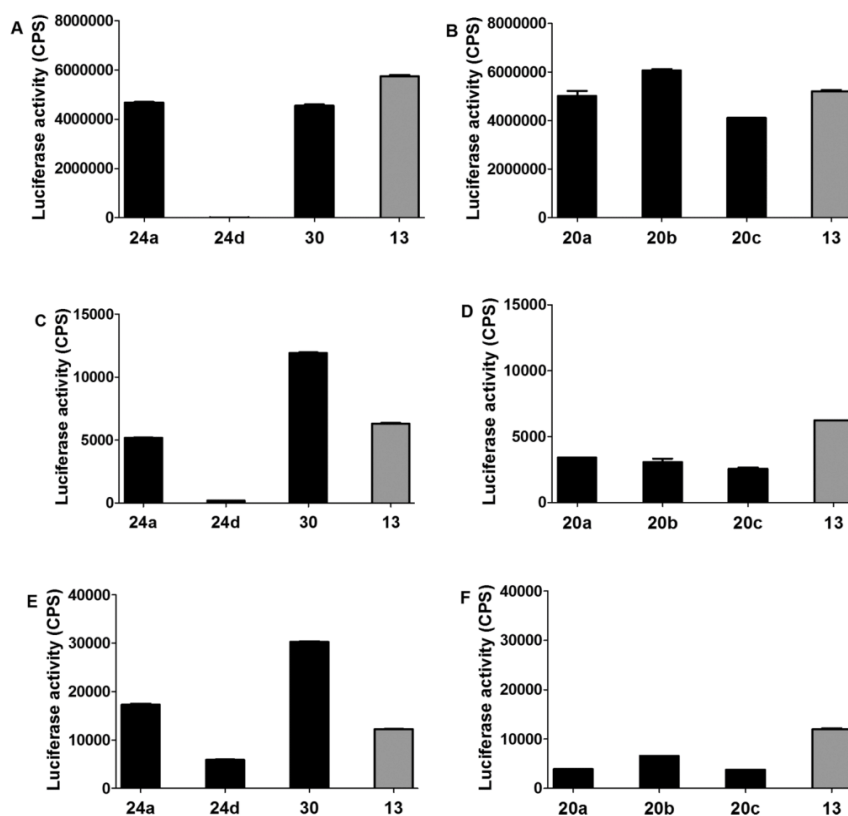


**Figure 2.** *In vitro* transfection of eGFP mRNA formulated with 13 in HeLa (A), human fibroblasts (B), and rat aorta muscle cells (C), or with 30 in HeLa (D), human fibroblasts (E), and rat aorta muscle cells (F). Cells were transfected with 0.5  $\mu\text{g}$  of mRNA formulated with 13 or 30 at a charge ratio of 5. Plates were incubated 24 h before microscopy observation.

and both cell types displayed similar trends (Figure 3C–F). Indeed, in both cases, the best transfection efficiency was again obtained with diester 30, which led to higher expression values than the reference molecule 13. Concerning the molecule with an adipic linker 24a, the expression was comparable to the results

obtained with 13. However, we could clearly see that changing the hydrophobic tail had a negative impact on the transfection of these two types of cells. Indeed, myristyl 20a, palmityl 20b, and stearyl 20c derivatives all displayed lower expression compared to 13.





**Figure 3.** *In vitro* transfection of plasmid DNA encoding luciferase in different cells. HeLa cells (A,B), rat aorta smooth muscle cells (C,D), and human fibroblasts cells (E,F) were transfected with 0.5  $\mu$ g of DNA formulated with each ionizable lipid at a charge ratio of 5. Data represent mean  $\pm$  SEM luciferase activity in counts per second (CPS) 24 h post-transfection for each nanocarrier compared to 13 (gray).

These experiments led us to the conclusion that both the linker and the hydrophobic tail had an impact on the DNA transfection efficiency in primary cells, with the dioleil chains showing the best results compared to smaller and/or nonsaturated chains. The linker as well proved to be an important part, as either lower transfection (disulfide **24d**) or better transfection (diester **30**) compared to the reference molecule **13** was obtained.

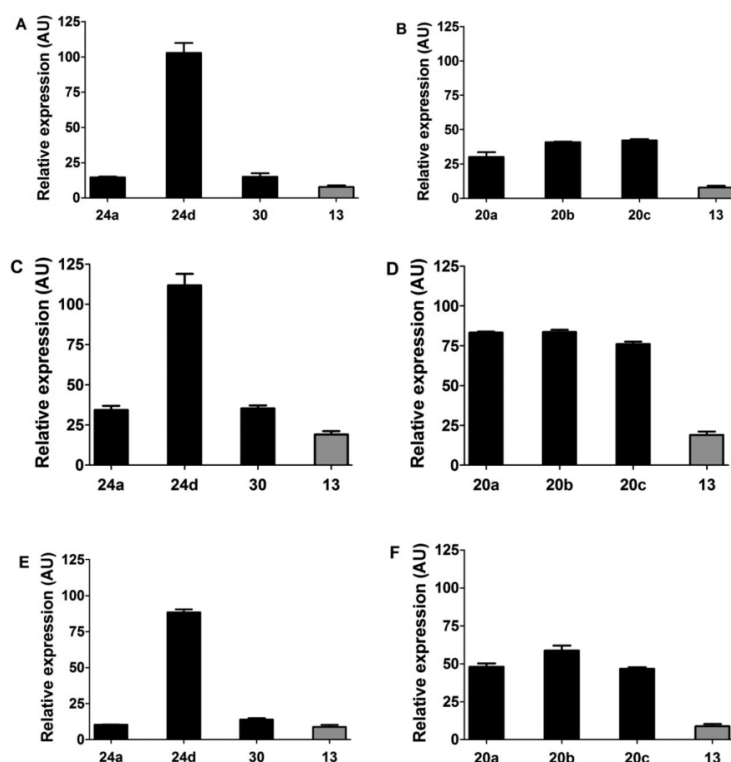
In addition, we evaluated the transfection efficiency by measuring the percentage of transfected HeLa cells by flow cytometry. For this purpose, DNA plasmids encoding eGFP were formulated with the lipid **13** or one of its analogues. The results confirmed the trends observed in the DNA luciferase assay and in the eGFP mRNA experiment. Indeed, **24a** (adipic linker) and **30** (diester linker) both displayed similar or slightly higher expression levels (75–80% of transfected cells) compared to **13** (70% of transfected cells), while myristyl, palmityl, and stearyl derivatives were less efficient than **13** (with approximately 50% of transfected cells for **20a**, **20b**, and **20c**). As in previous experiments, low transfection was observed with disulfide-containing lipid **24d**.

We next assessed the gene silencing potential after transfection with the various ionizable lipids. We performed RNAi experiments with siRNA targeting the endogenous lamin A/C expression in murine or human cells (Figure 4). Here, RT-qPCR results indicated that cells transfected with **13**/siRNA, **24a**/siRNA, and **30**/siRNA complexes had very little residual lamin A/C expression, with less than 15% in HeLa and human

fibroblasts cells and around 20–25% in C2C12 cells, compared to cells transfected with nonformulated siRNA (which resulted in more than 95% of expression, data not shown). These results clearly demonstrate that these complexes allow for the efficient knockdown of the expression of an endogenous gene in different cell types. However, modifying the hydrophobic tail to myristyl, palmityl, or stearyl chains had a negative impact on the transfection, as **20a**, **20b**, and **20c** all displayed less efficient gene silencing properties with higher residual lamin A/C expression measured compared to **13**. Finally, as observed for mRNA and DNA, compound **24d** with a disulfide linker did not lead to any inhibition of expression compared to negative control (unformulated siRNA).

The versatile potency of **30** and **13** was evaluated in head-to-head comparison experiments with commercially available Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific). In the tested conditions, **30** appeared to be more potent than Lipofectamine 3000 for the *in vitro* transfection of mRNA and DNA, when siRNA experiments provided similar activities for both compounds (see Supporting Information, Figures S19–21). In addition, the cell survival was much higher with **30** (with close to 100% survival) compared to Lipofectamine 3000 (around 20% survival) in our experiments (see Supporting Information, Figure S22).

**Characterization of the Lipoplexes by CryoTEM.** Morphologies of complexes made with selected candidates **13**, **24a** (adipic linker), and **30** (diester linker) and nucleic acids,



**Figure 4.** Inhibition of lamin A/C expression. HeLa cells (A,B), C2C12 cells (C,D), or human fibroblast cells (E,F) were transfected with 150 ng (A,B) or 300 ng (C–F) of siRNA, formulated with each ionizable lipid at a charge ratio of 5 and compared to 13 (gray). The gene expression levels of lamin A/C were measured by qPCR analysis, normalized against the expression levels of HPRT (housekeeping gene). The results are expressed as the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formula. Bars represent mean values  $\pm$  SEM.

either mRNA (Figure 5A–C), plasmid DNA (Figure 5D–F), or siRNA (Figure 5G–I) were then observed by cryoTEM.

In the case of mRNA, the complexes exhibited various sizes, depending on the molecule. Complexes made with 13 exhibited sizes in a range of 200–500 nm while those formed with 24a appeared of about 200–300 nm (Figure 5A,B). Interestingly, very small complexes (about 70 nm in diameter) were observed with 30, in addition to larger complexes (200 to 500 nm) (Figure 5C). The morphology of these ARN complexes contained small globular features with sizes ranging about 20 nm in diameter.

Plasmid DNA mixed with 24a formed very large complexes, larger than  $1 \mu\text{m}$  (Figure 5E). In contrast, the sizes of DNA complexes formed with 13 and 30 were in the range of 200 and 500 nm (Figure 5D,F). As in the case of mRNA, small globular features (about 40 nm) comprising lipid and DNA appeared to assemble together leading to larger structures.

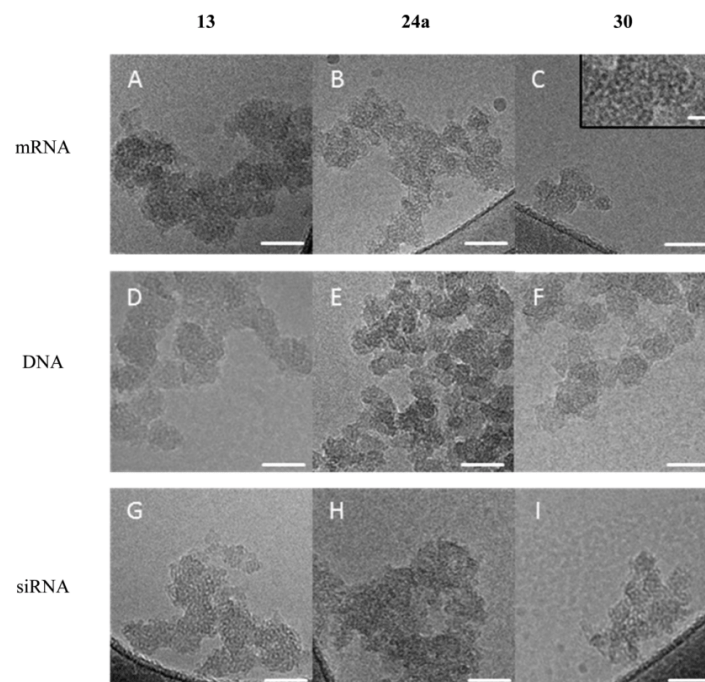
Finally, complexes formed with siRNA are similar to those formed with mRNA and DNA. Complexes made with 13 and 24a had a size in the range of 80 to 150 nm (Figure 5G,H), while those formed with 30 were of about 100 nm (Figure 5I). Like mRNA complexes, the structures of these siRNA complexes contained small globular features about 20 nm in diameter.

**Complexation Study of Disulfide Compound 24d.** Regardless of what type of nucleic acid we have used, the previous experiments showed that molecule 24d, containing a disulfide bridge in the linker, was a very poor transfection agent. In order to better understand the mechanism and the reasons for

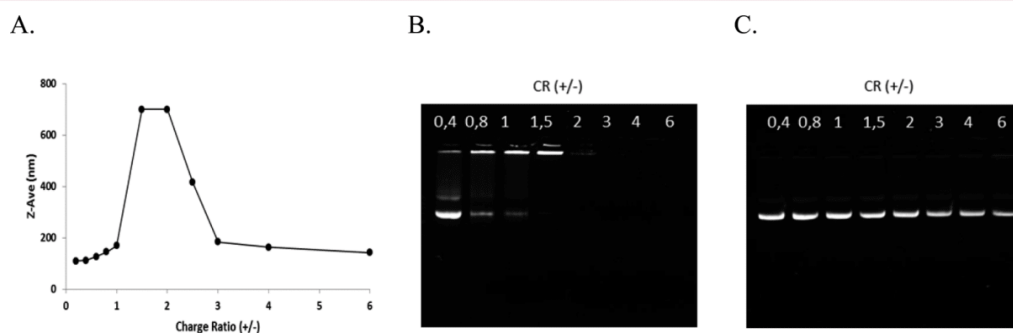
such poor performance, we analyzed the formulations obtained with DNA and 24d by monitoring the size of the lipoplexes and the DNA complexation.

The size of the lipoplex, which is linked to the colloidal stability, is a key parameter for nucleic acid delivery. To assess the mean diameter of the system, dynamic light scattering was used. Figure 6A illustrates the evolution of the mean diameter as a function of the charge ratio; we could observe that 24d follows the classical three-zone colloidal stability observed for many ionizable lipids.<sup>43</sup> Zone A (CR 0.2 to 1) comprised colloiddally stable complexes with a negative charge ratio and uncondensed DNA surrounding the lipoplexes. Zone B complexes were essentially neutrally charged (CR 1.5 to 2) with condensed DNA contained within colloiddally unstable aggregates. Lipoplexes from zone B exhibited a visible precipitate. Thus, an arbitrary value of 700 nm was attributed to those complexes since the diameter of the precipitated lipoplexes could not be measured by dynamic light scattering. Finally, zone C (CR > 2.5) lipoplexes were composed of colloiddally stable particles with condensed DNA and positive charges, thus strongly repelling each other.

Agarose gel electrophoresis experiments on a 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide were used to follow DNA complexation, by assessing the relative amounts of DNA that were free or incorporated into the lipoplex. Figure 6B shows that the amount of free DNA decreased as the charge ratio ( $\pm$ ) increased. For charge ratios between 0 and 1, free DNA molecules were present and migrated out of the well. For charge ratios above 1,



**Figure 5.** CryoTEM images of complexes made of mRNA mixed with 13 (A), 24a (B), or 30 (C), plasmid DNA mixed with 13 (D), 24a (E), or 30 (F), and siRNA mixed with 13 (G), 24a (H), or 30 (I). Scale bars are 50 nm (A–I) and 10 nm (inset). Complexes were prepared by mixing 0.5  $\mu$ g of nucleic acids with the corresponding lipid at charge ration ( $\pm$ ) of 5.



**Figure 6.** Physico-chemical characterization of 24d/DNA lipids complexes. (A) Colloidal stability of lipoplexes, as a function of the charge ratio and determined by dynamic light scattering. The analysis was done after 10 min of complexation at room temperature. Lipoplexes from zones A and C were stable; whereas those from zone B exhibited a visible precipitate (thus, an arbitrary value of 700 nm was attributed). (B,C) Agarose gel electrophoresis of lipoplexes of DNA formulated with 24d in the absence (B) or in the presence (C) of 10 mM DTT.

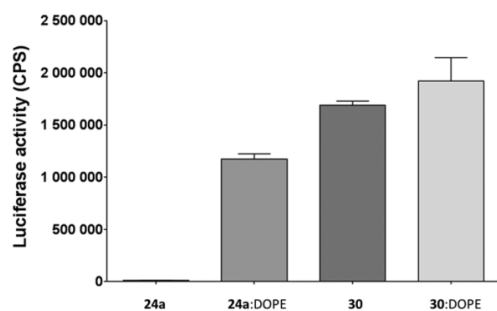
no free DNA was observed and aggregates were formed, which did not migrate out of the well. Again, this behavior is classical for ionizable lipids used as transfection reagents.

The same electrophoresis experiment was repeated after 30 min of incubation of the 24d/DNA lipoplexes in the presence of reducing agent DTT (Figure 6C). What was observed is a quantitative release of the DNA after incubation with DTT, independently of the charge ratio ( $\pm$ ). This suggests that the DTT treatment of the 24d/DNA complexes led to the cleavage of the S–S bond, the perturbation of the lipoplexes, and that the DNA molecules that were entrapped in the lipoplexes became free and migrated out of the well. This was in good agreement with what was expected and confirmed the ability of DTT to reduce cleavable functions as the disulfide bridge.

These two experiments illustrated that 24d is able to complex DNA in the same way as other ionizable lipids in nonreducing environment (the other molecules prepared previously were also tested for comparison and showed similar behaviors, data not shown). The experimental observations were different in the presence of reducing agent DTT, as 24d entirely lost his ability to form lipoplex. For the other molecules of the series, the DTT treatment had no impact on the lipoplexes (data not shown).

**Liposomal Formulations.** Next, we decided to investigate the behavior of disulfide 24d and diester 30 (our best candidate) lipids used as liposomal form, where a different delivery mechanism takes place. In this context, liposomes were prepared by mixing 24d or 30 with neutral colipid DOPE, in a 1:1 molar ratio, as previously described.<sup>31</sup> The liposome preparations were then





**Figure 7.** *In vitro* transfection of plasmid DNA encoding luciferase in different cells comparing micellar (24a, 30) and liposomal (24a:DOPE, 30:DOPE) formulations. HeLa cells were transfected with 0.5  $\mu$ g of DNA formulated with each formulation at a charge ratio of 5. Data represent mean  $\pm$  SEM luciferase activity in count per second (CPS) 24 h post-transfection for each nanocarrier.

formulated with DNA, at a charge ratio of 5, and the transfection efficiency compared to micellar formulations (Figure 7). The results obtained showed that, as seen in Figure 3, micellar preparations of 24d were not able to transfect DNA molecules. The results were different when the liposomal formulation was used, as high transfection efficiency was observed with 24d:DOPE liposomes, that reached almost the same level as the diester 30 under the micellar form. However, results showed that for molecule 30, formulations as micellar or liposomal form provided approximately the same transfection efficiency.

## DISCUSSION

These sets of results coming from the study of the transfection efficiency with three different types of nucleic acids gave us some useful information about the properties of the aminoglycoside lipidic derivatives and their mechanism of action.

It was observed that “parent” molecule 13 is a good and versatile transfecting agent. Indeed, it provided good transfection potency in the case of mRNA and DNA and was also among the best molecules tested for gene silencing using siRNA. This strengthens the data available in the literature about 13 and related aminoglycoside family members as efficient vectors for nucleic acid delivery.<sup>27–31</sup>

In addition, the new tobramycin lipidic derivatives described in this study allowed us to draw some conclusions on the key structural features of this type of molecule.

Concerning the hydrophobic domain, we could observe that all modifications (with the exception of palmityl derivative 20b in the mRNA experiments, Figure 1) led to detrimental effects compared to the dioleil chain present in the reference molecule 13. It can therefore be concluded that saturated and/or shorter than C18 chains are less effective for nucleic acid delivery. This observation is rather in good agreement with what was previously described in the literature about other families of ionizable lipids and could be attributed to less favorable conditions for the endosomal escape.<sup>18</sup>

The linker and hydrophobic portions of compound 30 were designed using encouraging results from the literature with ionizable lipid DOTAP. Indeed, DOTAP, which contains ester functions in the linker and two oleyl chains as hydrophobic part, showed higher transfection efficiency and reduced toxicity compared to DOTMA, its analogue bearing ether functions.<sup>41,42</sup>

In our experiments, the introduction of such ester functions on the linker (with similar hydrophobic domain than in the case

of 13) also led to improved transfection efficiency. This was especially true in the case of mRNA, where 30 appeared to be 2- to 3-fold more efficient than reference molecule 13, on the three cell types tested, leading to very high transfection.

The fluorescence experiments using eGFP mRNA and DNA as reporter genes provided some insights on the mechanism of this improved delivery. Indeed, the percentage of transfected cells obtained with HeLa and fibroblasts cells for 13 and 30 were very similar. The pictures in Figure 2 clearly show that 13 was as efficient as 30 in terms of numbers of transfected cells (with approximately 80% of transfected HeLa cells and 30% of human fibroblasts) and that both compounds display very low cytotoxicity, with around 90% of viable cells. The improved efficacy of 30 is therefore not related to a lower toxicity (as we could expect with results comparing DOTMA and DOTAP). More surprisingly, it does not seem to be correlated to a better biodegradability either. Indeed, we performed stability studies where 13 and 30 were mixed with porcine liver esterases, and we followed by HPLC the degradation of the molecules. We were expecting that 30 would degrade faster than 13, due to the presence of the ester bonds that should be cleaved by these enzymes and that the improved features of 30 could be explained by a better biodegradability. Unfortunately, no difference could be detected in terms of stability toward these esterases (data not shown).

The better efficiency of 30 could be explained by the fluorescence experiment on rat aorta muscle cells. The observations of single transfected cells clearly showed that the transfection with 30 led to a higher expression of eGFP protein compared to 13 (Figure 2C,F). This seems to demonstrate that, for the same number of transfected cells, 30 is able to deliver more copies of mRNA encoding eGFP inside the cell cytoplasm. We believe that this could result from an improved release mechanism of nucleic acids in the cytosol. Indeed, the fact that 30 was the best molecule of the series both for mRNA and DNA transfection, and one of the best for siRNA, tends to indicate that the improved feature of 30 influences the same step of the delivery mechanism, independently of the nucleic acid transported.

As stated in the introduction, the mechanism for the intracellular delivery of nucleic acids mediated by ionizable lipids is composed of several distinct steps, and the key endosomal escape step is influenced by the ionizable lipids used as delivery vehicles.<sup>24,25</sup> In our case, the presence of ester bonds in the linker portion of 30, which makes it endogenous to natural lipids, may be responsible for better hydrophobic interactions with the natural anionic phospholipids, when compared to the other molecules of the series. The better transfection potency of 30 may be a consequence of these improved interactions, favoring the formation of new bilayer structures obtained from the association of the anionic lipids from the membrane and the cationic lipids from the lipoplex. Results tend to suggest that these interactions are able to promote a more efficient release of mRNA, DNA, or siRNA from the lipoplex and from the endosome.

Molecule 24d, with a disulfide function in the linker structure, provided negative results in all types of nucleic acids under micellar form but still allowed us to drive some conclusions. Previous reports have demonstrated that the introduction of a disulfide bridge in the structure of a given ionizable lipid can lead to the reduction of the lipid in the intracellular compartment, causing the destabilization of the complex and the release of the DNA into the cytosol. However, this improved release compared to nonreducible molecules was not necessarily



associated with improved transfection efficacy in micellar complexes, and the effect was more pronounced in liposomal formulations.<sup>35–39</sup> We have shown in our study that **24d** was able to complex nucleic acids in a similar way than the other molecules of the series. However, in the presence of reducing agent DTT, **24d** showed a quantitative release of the DNA molecules in the gel retardation assay (Figure 6). It can therefore be envisioned that such reduction of the disulfide bridge may also occur in the endosomal compartment, leading to the separation of the tobramycin headgroup and the lipophilic tail. This seems to be detrimental for the lipid mixing mechanism because both electrostatic and hydrophobic interactions are necessary to trigger the disruption of the endosomal membrane. With the lipid **24d**, the nucleic acids entrapped in the endosome are therefore not released in the cytoplasm and are degraded by fusion with lysosomes. To confirm the prevalence of the lipid mixing mechanism in the previous tests, we performed additional experiments where **24d** was used as a liposomal form, in an equimolar formulation with the neutral fusogenic colipid DOPE, which induces another endosomal escape mechanism. In this experiment, the **24d**:DOPE formulation proved to be effective for the intracellular delivery of plasmid DNA, while the **24d** micellar version did not transfect at all (Figure 7). The mechanism that takes place in the presence of the colipid is different since DOPE is known to lead to a fusion and destabilization of the membrane at reduced pH.<sup>44</sup>

These results demonstrated that the endosomal escape is a key step for the effective delivery of nucleic acids when using a micellar formulation. In the case of low-transfecting agents like **24d**, the ineffectiveness of the lipid mixing mechanism can be counterbalanced by the addition of a neutral colipid able to induce an alternative fusion mechanism for the disruption of the endosomal membrane.

Formulating a given ionizable synthetic delivery system with a neutral colipid (in our case, DOPE) usually led to higher transfection potency compared to the micellar form, but increases the complexity of the formulation. In our case, the results demonstrated that the micellar form of **30** was able to reach the same transfection as the **30**:DOPE liposomes (Figure 7). These results suggest that the two mechanisms (lipid-mixing with micelles and fusion with liposomes) are well-distinct since no synergistic effect was observed with **30**.

Rational design of **30** allowed us to reach the same transfection efficiency in the presence or in the absence of the helper lipid DOPE. We assumed that the usually observed lower efficacy of the micellar form was compensated by the improved lipid mixing mechanism with **30**. This property is of particular interest for the development of a simple, single-component delivery system.

In addition, cryoTEM analysis of mRNA, DNA, and siRNA formulations with **30** led to complexes with small globular features (20–40 nm, Figure 5). In general, complexes formed with **30** were found to be rather small, especially in the case of mRNA where 70 nm complexes were observed. The improved properties observed with **30** for the delivery of mRNA could also be associated with these small complexes, as reports indicate that the endocytosis pathway is dependent on the size of the particles.<sup>45–47</sup> In particular, Hoekstra et al. described that for complexes with sizes below 200 nm, the clathrin-mediated pathway of entry was involved, while internalization with caveolae was present for larger particles.<sup>48</sup> We hypothesized that **30**/mRNA complexes could induce a clathrin-mediated endocytosis, while the larger lipoplexes were internalized via caveolae, but further

studies will be necessary to clearly understand the influence of the ionizable lipids on the size of the complexes and therefore on the mechanisms of endocytosis.

In conclusion, we assessed the ability of tobramycin lipidic derivatives to efficiently deliver genetic information with various types of nucleic acids. This structure–activity relationship led to the identification of the tobramycin-derived lipid **30**, which provided excellent transfection efficiency on different cell types with mRNA, DNA, and siRNA. We assumed that these improved properties were related to the presence of endogenous ester functions that favor the lipid mixing mechanism and trigger a more efficient endosomal escape of the nucleic acids. From the generated data, **30** appears to be an efficient, monocomponent and versatile delivery system, forming small particles when formulated with nucleic acids, and therefore, it represents a very promising candidate for further development, especially in the innovative field of mRNA-based therapeutics.

## ■ EXPERIMENTAL SECTION

**General Methods for Synthesis.** All commercially available materials were purchased from Sigma-Aldrich, with the exception of tobramycin, which was purchased from Carbosynth, and were used without further purification. NMR experiments were recorded on a Bruker Advance 400 MHz spectrometer (400 MHz for <sup>1</sup>H and 100 MHz for <sup>13</sup>C). Spectra were acquired at 300 K, using deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>) or deuterated methanol (MeOD) as the solvent. Chemical shifts for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra were recorded in parts per million using the residual nondeuterated solvent as the internal standard (for CDCl<sub>3</sub>, 7.26 ppm, <sup>1</sup>H, 77.16 ppm, <sup>13</sup>C; for MeOD, 3.31 ppm, <sup>1</sup>H, 49.00 ppm, <sup>13</sup>C). TFA signals were not described in the <sup>13</sup>C spectra. Flash chromatographies were performed on a Grace Reveleris system, equipped with either Reveleris Silica cartridges, using a gradient of MeOH in DCM as mobile phase or Reveleris C18 reversed-phase cartridges, using a gradient of MeOH in H<sub>2</sub>O (+ 0.05% TFA) as mobile phase. The detection was performed with an evaporative light-scattering detector (ELSD). High-resolution mass spectrometry experiments were performed on a qTOF Synapt2 HDMS (Waters Corporation) apparatus; electrospray in positive mode was used (ion trap). UHPLC analyses were run on a Waters ACQUITY H-Class system equipped with an ELSD detector. Analyses were performed on an ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 × 50 mm, particle size 1.8 μm). The mobile phase consisted of ACN/H<sub>2</sub>O (50/50) + 0.1% TFA (A) and ACN + 0.1% TFA (B). All final compounds showed purity higher than 95%.

**Diroleamide (3).** To a solution of oleylamine **1** (6 mL, 18.23 mmol) in DCM (75 mL) were successively slowly added oleoyl chloride **2** (6.03 mL, 18.23 mmol) and Et<sub>3</sub>N (2.53 mL, 18.23 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred 1 h at 0 °C and then 20 h at rt. The mixture was then washed with H<sub>2</sub>O and brine, and the organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH) to give the expected amide **3** as a white sticky solid (8.73 g, 90%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 0.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.25–1.31 (m, 42H), 1.48–1.51 (m, 2H), 1.63–1.65 (m, 2H), 1.89–2.06 (m, 8H), 2.16 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.25 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 5.31–5.45 (m, 4H).

**Diroleylamine (4).** To a suspension of LiAlH<sub>4</sub> (1.56 g, 41.03 mmol, 2.5 equiv) in THF (80 mL) was slowly added a solution of diroleamide **3** (8.73 g, 16.41 mmol, 1 equiv) in THF (20 mL) at 0 °C. The mixture was then heated overnight at 55 °C. Once the mixture cooled down to rt, H<sub>2</sub>O (1.5 mL), NaOH 15% (1.5 mL), and H<sub>2</sub>O (4.5 mL) were successively and slowly added. The resulting mixture was filtered and the precipitate washed with DCM. The filtrate was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was used in the next step without any further purification. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 0.88 (t, *J* = 6.4 Hz, 6H), 1.25–1.29 (m, 44H), 1.45–1.49 (m, 4H), 1.98–2.03 (m, 8H), 2.60 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H), 5.33–5.38 (m, 4H).

**4-(Diroleylamino)-4-oxobutanoic Acid (5).** To a solution of crude **4** (16.41 mmol) in DCM (300 mL) were successively added succinic anhydride (3.28 g, 32.82 mmol, 2 equiv) and Et<sub>3</sub>N (4.5 mL, 32.82 mmol,

2 equiv). The mixture was stirred at rt overnight, then quenched by addition of 1 M HCl. After extraction, the organic layer was further washed with 1 M HCl and water (3 times), dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH) to afford the desired acid **5** (6.35 g, 62% over 2 steps).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  0.88 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6H), 1.26–1.30 (m, 44H), 1.52–1.56 (m, 4H), 1.97–2.04 (m, 8H), 2.68 (s, 4H), 3.22 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 3.32 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 5.30–5.38 (m, 4H), 11.90 (bs, 1H).

**6'-Benzoyloxycarbonyl-1,2',3,3''-tetra(trimethylsilyl)-ethylcarbamate-tobramycin (10)**. Tobramycin **6** (1 g, 2.14 mmol, 1 equiv) was dissolved in  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL).  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.3 mL, 2.14 mmol, 1 equiv) and a solution of *N*-benzyloxycarbonyloxy-5-norbornene-2,3-dicarboximide **7** (0.67 g, 2.14 mmol, 1 equiv) in DMF (10 mL) were successively added and the mixture stirred at rt for 24 h. A solution of 2-(trimethylsilyl)ethyl-4-nitrophenylcarbonate **9** (2.65 g, 11.12 mmol, 5.2 equiv) in DMF (20 mL) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.55 mL, 11.12 mmol, 5.2 equiv) were then added, and the yellow solution was stirred at 55 °C. After 48 h, the mixture was concentrated and the residue taken up with  $\text{EtOAc}$ , before washing with 1 M NaOH (3 times), water, and brine. The organic fraction was dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH) to afford the expected product **10** (1.8 g, 71%).  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 25 °C)  $\delta$  0.04–0.06 (m, 36H), 0.99–1.03 (m, 8H), 1.48–1.51 (m, 1H), 1.64–1.70 (m, 1H), 1.99–2.10 (m, 2H), 3.40–3.76 (m, 15H), 3.89–3.91 (m, 1H), 4.08–4.16 (m, 8H), 5.06–5.13 (m, 4H), 7.35–7.37 (m, 5H).  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD, 25 °C)  $\delta$  -1.4, 18.6, 18.7, 34.3, 35.7, 42.4, 51.3, 51.6, 57.6, 62.1, 64.0, 66.6, 69.4, 71.8, 73.5, 74.8, 76.7, 83.0, 84.2, 99.3, 99.8, 128.9, 129.0, 129.5, 138.4, 158.5, 158.7, 159.8, 160.1.

**1,2',3,3''-Tetra(trimethylsilyl)ethylcarbamate-tobramycin (11)**. To a solution of **10** (1.8 g, 1.52 mmol, 1 equiv) in degassed wet MeOH (containing 10% of  $\text{H}_2\text{O}$ , 50 mL) was added 10% Pd/C (0.21 g, 0.1 equiv). Three cycles of vacuum/ $\text{N}_2$  were applied, followed by three cycles of vacuum/ $\text{H}_2$ . The mixture was stirred overnight, then filtered over a pad of Celite, and washed with MeOH. The filtrate was concentrated *in vacuo* and the residue purified by flash chromatography (DCM/MeOH) to afford the expected free amine **11** (1.09 g, 70%).  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 25 °C)  $\delta$  0.00–0.02 (m, 36H), 0.94–0.98 (m, 8H), 1.45–1.49 (m, 1H), 1.57–1.65 (m, 1H), 1.91–2.05 (m, 2H), 2.59–2.64 (m, 1H), 2.94–2.97 (m, 1H), 3.33–3.55 (m, 6H), 3.55–3.74 (m, 7H), 3.86–3.88 (m, 1H), 4.03–4.17 (m, 8H), 5.02 (s, 1H), 5.20 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD, 25 °C)  $\delta$  -1.4, 18.5, 18.6, 18.7, 30.7, 34.6, 43.3, 51.2, 51.3, 51.6, 62.2, 63.9, 64.0, 64.2, 67.5, 69.3, 71.8, 73.5, 73.9, 74.7, 76.7, 76.9, 81.9, 84.1, 98.2, 99.3, 99.8, 158.5, 158.7, 158.9, 160.0.

***N,N*-Dioleil-succinamide-1,2',3,3''-tetra(trimethylsilyl)-ethylcarbamate-tobramycin (12)**. To a solution of **11** (1 g, 0.95 mmol, 1 equiv) in DMF (15 mL) was added a solution of **5** (0.713 g, 1.045 mmol, 1.1 equiv) in DMF (50 mL). HBTU (432 mg, 1.14 mmol, 1.2 equiv) and DMAP (350 mg, 2.85 mmol, 3 equiv) were successively added, and the mixture was stirred at rt overnight. After concentration, the residue was taken up with  $\text{EtOAc}$  before washing with  $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , and brine. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH) to afford the expected compound **12** (1.05 g, 67%).  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 25 °C)  $\delta$  0.05–0.06 (m, 36H), 0.90 (t,  $J = 6.7$  Hz, 6H), 0.99–1.03 (m, 8H), 1.30–1.35 (m, 52H), 1.53–1.63 (m, 6H), 2.02–2.05 (m, 9H), 2.53–2.68 (m, 4H), 3.33–3.76 (m, 13H), 3.90–3.94 (m, 1H), 4.06–4.16 (m, 8H), 5.07 (s, 1H), 5.33–5.38 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD, 25 °C)  $\delta$  -1.3, 14.5, 18.6, 18.7, 18.8, 23.8, 27.9, 28.2, 28.8, 29.5, 29.9, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.8, 30.9, 31.8, 33.1, 33.6, 34.2, 41.3, 47.6, 51.3, 51.7, 57.6, 62.2, 64.0, 64.2, 66.9, 67.4, 69.5, 71.8, 73.5, 74.8, 77.0, 82.0, 84.1, 98.6, 99.7, 130.8, 130.9, 158.5, 158.7, 158.8, 160.1, 173.4, 175.6.

**Dioleil-succinyl-tobramycin (13)**. To a suspension of **12** (1 g, 0.61 mmol) in DCM (5 mL) was slowly added TFA (10 mL) at 0 °C. The solution was stirred at rt for 2 h, then concentrated. After three consecutive additions of MeOH and subsequent evaporations, the residue was purified by flash chromatography (reverse phase, C18-Silica,  $\text{H}_2\text{O}$  (+0.05%TFA)/MeOH) and lyophilized to give **13** (0.575 g, 62%).  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 25 °C)  $\delta$  0.90 (t,  $J = 6.7$  Hz, 6H), 1.29–1.31 (m,

52H), 1.44–1.63 (m, 4H), 1.98–2.03 (m, 8H), 2.19–2.22 (m, 1H), 2.51–2.53 (m, 3H), 2.69–2.72 (m, 2H), 3.39–3.92 (m, 14H), 5.09 (s, 1H), 5.33–5.42 (m, 4H), 5.43 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD, 25 °C)  $\delta$  14.5, 23.7, 27.9, 28.7, 29.1, 29.3, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.8, 31.0, 31.6, 33.0, 33.6, 40.7, 47.5, 50.0, 50.9, 56.7, 62.0, 65.7, 67.6, 69.9, 75.4, 76.1, 80.9, 85.5, 96.7, 101.8, 130.8, 130.9, 173.7, 175.6. HRMS: calculated for  $\text{C}_{58}\text{H}_{111}\text{N}_6\text{O}_{11}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  = 1067.8311, found 1067.8340.

**Dimyristamide (16a)**. To a solution of myristylamine **14a** (1 g, 4.68 mmol) in THF (40 mL) were successively slowly added myristoyl chloride **15a** (1.27 mL, 4.68 mmol) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.65 mL, 4.68 mmol) at 0 °C. A precipitate immediately formed after  $\text{Et}_3\text{N}$  addition. After 20 h at rt, the solid was filtered, washed with  $\text{H}_2\text{O}$ , and dried to give the expected amide **16a** as a white sticky solid (1.94 g, 99%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  0.87 (t,  $J = 6.8$  Hz, 6H), 1.24–1.27 (m, 44H), 1.45–1.47 (m, 2H), 2.14 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 3.22 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 5.37 (bs, 1H).

**Dipalmitamide (16b)**. To a solution of palmitylamine **14a** (1 g, 4.14 mmol) in THF (35 mL) and DMF (30 mL) were successively slowly added palmitoyl chloride **15b** (1.26 mL, 4.14 mmol) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.58 mL, 4.14 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred 1 h at 0 °C and then 20 h at rt. After addition of  $\text{EtOAc}$ , the mixture was washed with  $\text{H}_2\text{O}$  and brine; the organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH) to give the expected amide **16b** as a white solid (1.44 g, 65%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  0.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 6H), 1.25–1.28 (m, 50H), 1.46–1.50 (m, 2H), 1.46–1.50 (m, 2H), 2.14 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 3.23 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 5.35 (bs, 1H).

**Dimyristylamine (17a)**. Following the procedure described for compound **4**, reduction of **16a** (1 g, 2.36 mmol) by  $\text{LiAlH}_4$  (0.23 g, 5.89 mmol) in THF (55 mL) provided amine **17a**, which was used in the next step without any further purification.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  0.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 6H), 1.24–1.28 (m, 50H), 2.59 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H).

**Dipalmitylamine (17b)**. Following the procedure described for compound **4**, reduction of **16b** (1 g, 2.08 mmol) by  $\text{LiAlH}_4$  (0.20 g, 5.21 mmol) in THF (55 mL) provided amine **17b**, which was used in the next step without any further purification.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  0.87 (t,  $J = 6.8$  Hz, 6H), 1.25–1.29 (m, 58H), 2.58 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H).

**4-(Dimyristylamino)-4-oxobutanoic Acid (18a)**. Following the procedure described for compound **5**, addition of succinic anhydride (0.37 g, 3.68 mmol) on **17a** (0.96 g, 1.84 mmol) in DCM (50 mL), in the presence of  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.50 mL, 3.68 mmol), provided the desired acid **18a** (0.94 g, 99%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  0.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 6H), 1.23–1.28 (m, 44H), 1.48–1.60 (m, 4H), 2.69 (s, 4H), 3.20–3.24 (m, 2H), 3.30–3.34 (m, 2H).

**4-(Dipalmitoylamino)-4-oxobutanoic Acid (18b)**. Following the procedure described for compound **5**, addition of succinic anhydride (0.27 g, 2.70 mmol) on **17b** (0.63 g, 1.35 mmol) in DCM (50 mL), in the presence of  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.38 mL, 3.70 mmol), provided the desired acid **18b** (0.47 g, 71%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  0.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 6H), 1.23–1.28 (m, 52H), 1.43–1.55 (m, 4H), 2.69 (s, 4H), 3.20–3.24 (m, 2H), 3.30–3.34 (m, 2H).

**4-(Distearylamino)-4-oxobutanoic Acid (18c)**. Following the procedure described for compound **5**, addition of succinic anhydride (0.38 g, 3.83 mmol) on distearylamine **17c** (1 g, 1.92 mmol) in DCM (50 mL), in the presence of  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.53 mL, 3.83 mmol), provided the desired acid **18c** (1.14 g, 95%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  0.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 6H), 1.23–1.28 (m, 60H), 1.48–1.60 (m, 4H), 2.69 (s, 4H), 3.20–3.24 (m, 2H), 3.30–3.34 (m, 2H).

***N,N*-Dimyristyl-succinamide-1,2',3,3''-tetra(trimethylsilyl)-ethylcarbamate-tobramycin (19a)**. Following the procedure described for compound **12**, reaction of amine **11** (200 mg, 0.18 mmol) with acid **18a** (102 mg, 0.20 mmol), in the presence of HBTU (83 mg, 0.22 mmol) and DMAP (66 mg, 0.54 mmol) in DMF (10 mL), provided the expected compound **19a** (117 mg, 41%).  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 25 °C)  $\delta$  0.05 (m, 36H), 0.90 (t,  $J = 6.8$  Hz, 6H), 0.99–1.04 (m, 8H), 1.28–1.41 (m, 45H), 1.51–1.55 (m, 2H), 1.63–1.67 (m, 3H), 1.98–2.16 (m, 2H), 2.54–2.71 (m, 4H), 3.30–3.77 (m, 18H), 3.91–3.93 (m, 1H), 4.09–4.18 (m, 9H), 5.08–5.12 (m, 1H), 5.26 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD, 25 °C)  $\delta$  -1.3, 14.5, 18.6, 18.7, 18.8, 23.8, 27.9, 28.2, 28.8, 30.5, 30.7, 30.8, 30.9, 31.9, 33.1, 41.4, 47.5, 51.3, 51.6, 57.7, 62.2, 64.0, 64.2, 64.6,



66.7, 69.4, 71.9, 73.6, 74.8, 76.8, 77.0, 99.3, 99.8, 158.5, 158.7, 158.9, 160.1, 173.4, 175.6.

*N,N*-Dipalmytoyl-succinamide-1,2',3,3''-tetra(trimethylsilyl)-ethylcarbamate-tobramycin (**19b**). Following the procedure described for compound **12**, reaction of amine **11** (200 mg, 0.18 mmol) with acid **18b** (113 mg, 0.20 mmol), in the presence of HBTU (83 mg, 0.22 mmol) and DMAP (66 mg, 0.54 mmol) in DMF (10 mL), provided the expected compound **19b** (74 mg, 25%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.05 (m, 36H), 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H), 0.99–1.03 (m, 8H), 1.26–1.38 (m, 53H), 1.51–1.54 (m, 2H), 1.63–1.66 (m, 3H), 1.98–2.12 (m, 2H), 2.54–2.75 (m, 4H), 3.30–3.76 (m, 18H), 3.91–3.93 (m, 1H), 4.08–4.18 (m, 9H), 5.07–5.11 (m, 1H), 5.24 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 25 °C) δ -1.3, 14.5, 18.6, 18.7, 18.8, 23.8, 27.9, 28.1, 28.8, 30.4, 30.5, 30.6, 30.7, 30.8, 31.9, 33.1, 41.4, 47.5, 51.3, 51.7, 57.7, 62.2, 64.0, 64.2, 64.6, 66.7, 69.4, 71.9, 73.5, 74.8, 76.8, 77.1, 99.3, 99.8, 158.5, 158.7, 158.9, 160.1, 173.4, 175.6.

*N,N*-Distearyl-succinamide-1,2',3,3''-tetra(trimethylsilyl)-ethylcarbamate-tobramycin (**19c**). Following the procedure described for compound **12**, reaction of amine **11** (200 mg, 0.18 mmol) with acid **18c** (124 mg, 0.20 mmol), in the presence of HBTU (83 mg, 0.22 mmol) and DMAP (66 mg, 0.54 mmol) in DMF (10 mL), provided the expected compound **19c** (110 mg, 36%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.07 (m, 36H), 0.92 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H), 1.00–1.05 (m, 8H), 1.28–1.41 (m, 61H), 1.51–1.54 (m, 2H), 1.55–1.71 (m, 3H), 1.96–2.14 (m, 2H), 2.53–2.74 (m, 4H), 3.30–3.84 (m, 18H), 3.91–3.93 (m, 1H), 4.10–4.26 (m, 9H), 5.09–5.12 (m, 1H), 5.26 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 25 °C) δ -1.4, 14.7, 18.6, 18.7, 18.8, 23.9, 27.9, 28.0, 28.8, 29.9, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.7, 30.8, 31.2, 32.0, 33.3, 41.6, 47.6, 51.2, 51.8, 57.5, 62.2, 64.0, 64.1, 64.5, 66.6, 69.4, 72.0, 73.4, 74.9, 76.8, 77.1, 99.2, 99.9, 158.5, 158.7, 158.9, 160.2, 173.5, 175.6.

*Dimyristyl-succinyl-tobramycin* (**20a**). Following the procedure described for **13**, treatment of **19a** (97 mg, 0.060 mmol) by TFA (2 mL) in DCM (1 mL) provided **20a** (49 mg, 58%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.22–1.32 (m, 45H), 1.44–1.54 (m, 2H), 1.57–1.64 (m, 2H), 1.95–2.03 (m, 2H), 2.19–2.23 (m, 1H), 2.51–2.54 (m, 2H), 2.70–2.73 (m, 2H), 3.32–3.40 (m, 4H), 3.42–3.60 (m, 7H), 3.65–3.68 (m, 2H), 3.71–3.91 (m, 7H), 5.09 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.44 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 25 °C) δ 14.4, 23.7, 27.9, 28.1, 28.7, 29.1, 29.7, 30.4, 30.5, 30.6, 30.7, 30.8, 31.0, 31.7, 33.1, 40.7, 47.5, 50.1, 51.0, 56.7, 62.0, 65.8, 67.6, 70.0, 75.4, 75.5, 76.2, 81.2, 85.6, 96.8, 101.8, 173.8, 175.6. HRMS: calculated for C<sub>50</sub>H<sub>98</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub> [M + H]<sup>+</sup> = 959.7372, found 959.7354.

*Dipalmityl-succinyl-tobramycin* (**20b**). Following the procedure described for **13**, treatment of **19b** (74 mg, 0.046 mmol) by TFA (2 mL) in DCM (1 mL) provided **20b** (14 mg, 21%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.11–1.29 (m, 53H), 1.42–1.54 (m, 2H), 1.57–1.65 (m, 2H), 1.94–2.02 (m, 2H), 2.19–2.21 (m, 1H), 2.51–2.55 (m, 2H), 2.62–2.71 (m, 2H), 3.31–3.39 (m, 4H), 3.40–3.53 (m, 7H), 3.64–3.69 (m, 2H), 3.75–3.90 (m, 7H), 5.09 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 5.43 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 25 °C) δ 14.4, 23.7, 27.9, 28.1, 28.7, 29.1, 29.4, 29.7, 30.4, 30.5, 30.6, 30.7, 30.8, 31.0, 31.7, 33.1, 40.7, 47.5, 50.1, 50.9, 56.7, 62.0, 65.7, 67.6, 70.0, 75.5, 76.3, 81.0, 85.5, 96.8, 101.8, 173.8, 175.6. HRMS: calculated for C<sub>54</sub>H<sub>106</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub> [M + H]<sup>+</sup> = 1015.7998, found 1015.7961.

*Distearyl-succinyl-tobramycin* (**20c**). Following the procedure described for **13**, treatment of **19c** (60 mg, 0.036 mmol) by TFA (2 mL) in DCM (1 mL) provided **20c** (26 mg, 47%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H), 1.23–1.40 (m, 61H), 1.48–1.58 (m, 2H), 1.59–1.68 (m, 2H), 1.93–2.05 (m, 2H), 2.16–2.24 (m, 1H), 2.49–2.59 (m, 2H), 2.60–2.72 (m, 2H), 3.31–3.40 (m, 4H), 3.40–3.59 (m, 7H), 3.62–3.70 (m, 2H), 3.73–3.95 (m, 7H), 5.09 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.44 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 25 °C) δ 14.4, 23.7, 27.9, 28.1, 28.7, 29.1, 29.7, 30.4, 30.5, 30.7, 30.8, 31.7, 33.1, 40.7, 47.5, 50.1, 50.9, 56.8, 62.1, 65.9, 67.7, 70.0, 75.6, 76.4, 81.0, 85.6, 89.2, 96.8, 101.9, 173.8, 175.6. HRMS: calculated for C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub> [M + H]<sup>+</sup> = 1071.8624, found 1071.8660.

*6-(Diioleilamino)-6-oxohexanoic Acid* (**22a**). Diioleilamine **4** (250 mg, 0.52 mmol, 1 equiv) and adipic acid **21a** (152 mg, 1.04 mmol, 2 equiv) were dissolved in THF (60 mL). EDC (120 mg, 0.62 mmol, 1.2 equiv) and DMAP (31 mg, 0.26 mmol, 0.5 equiv) were added, and the

mixture stirred at rt overnight. After concentration, the residue was taken up with EtOAc before washing with NH<sub>4</sub>Cl<sub>sat</sub> H<sub>2</sub>O, and brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH) to afford the expected compound **22a** (200 mg, 59%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H), 1.26–1.29 (m, 44H), 1.42–1.56 (m, 4H), 1.58–1.74 (m, 4H), 1.99–2.01 (m, 8H), 2.30–2.36 (m, 2H), 2.80 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.18 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.27 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 5.31–5.42 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 14.2, 23.9, 24.9, 25.8, 27.1, 27.2, 27.9, 29.0, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 29.9, 30.5, 31.7, 32.0, 32.8, 34.1, 46.3, 48.2, 129.8, 130.0, 172.5, 178.3.

*8-(Diioleilamino)-8-oxooctanoic Acid* (**22b**). Following the procedure described for **22a**, diioleilamine **4** (500 mg, 0.96 mmol) reacted with suberic acid **21b** (340 mg, 1.93 mmol) in THF (40 mL), in the presence of EDC (220 mg, 1.16 mmol) and DMAP (59 mg, 0.48 mmol, 0.5 equiv) to give compound **22b** (452 mg, 70%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.26–1.29 (m, 48H), 1.49–1.52 (m, 4H), 1.63–1.67 (m, 4H), 2.00–2.04 (m, 8H), 2.28 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.18 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.27 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 5.34–5.38 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 14.1, 23.5, 24.5, 25.4, 25.5, 25.6, 26.8, 26.9, 27.0, 27.2, 27.8, 28.6, 28.9, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 31.5, 31.8, 31.9, 32.6, 32.9, 33.9, 46.1, 48.1, 129.7, 129.8, 129.9, 173.0, 178.4.

*10-(Diioleilamino)-10-oxodecanoic Acid* (**22c**). Following the procedure described for **22a**, diioleilamine **4** (500 mg, 0.96 mmol) reacted with sebacic acid **21c** (390 mg, 1.93 mmol) in THF (40 mL), in the presence of EDC (220 mg, 1.16 mmol) and DMAP (59 mg, 0.48 mmol, 0.5 equiv) to give compound **22c** (382 mg, 52%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.26–1.30 (m, 52H), 1.49–1.53 (m, 4H), 1.62–1.64 (m, 4H), 2.00–2.05 (m, 8H), 2.27 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.34 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.27 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 5.30–5.36 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 14.1, 22.7, 24.7, 25.5, 25.6, 26.9, 27.0, 27.2, 27.8, 28.9, 29.0, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 31.8, 31.9, 32.6, 33.0, 34.0, 46.1, 48.1, 129.7, 129.8, 130.0, 173.1, 178.7.

*2-(Diioleilamino)-2-dithioglycolic Acid* (**22d**). Following the procedure described for **22a**, diioleilamine **4** (250 mg, 0.52 mmol) reacted with dithioglycolic acid **21d** (190 mg, 1.93 mmol) in DMF (60 mL), in the presence of EDC (110 mg, 0.62 mmol) and DMAP (30 mg, 0.25 mmol, 0.5 equiv) to give compound **22d** (283 mg, 80%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H), 1.24–1.28 (m, 44H), 1.53–1.57 (m, 4H), 1.97–2.20 (m, 8H), 3.22 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.34 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.56 (s, 2H), 3.71 (s, 2H), 5.31–5.40 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 14.2, 22.8, 25.8, 26.0, 27.0, 27.1, 27.2, 27.3, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.8, 29.9, 31.6, 31.9, 32.0, 32.7, 41.1, 41.8, 47.1, 49.0, 129.8, 130.1, 169.1, 171.3.

*N,N*-Diioleil-adipamide-1,2',3,3''-tetra(trimethylsilyl)-ethylcarbamate-tobramycin (**23a**). Following the procedure described for compound **12**, reaction of amine **11** (283 mg, 0.27 mmol) with acid **22a** (220 mg, 0.30 mmol), in the presence of HBTU (121 mg, 0.32 mmol) and DMAP (99 mg, 0.81 mmol) in DMF (30 mL), provided the expected compound **23a** (189 mg, 42%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.05 (s, 36H), 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.98–1.03 (m, 8H), 1.23–1.41 (m, 45H), 1.53–1.66 (m, 10H), 1.90–2.10 (m, 8H), 2.28–2.32 (m, 2H), 2.38–2.41 (m, 2H), 3.32–3.76 (m, 16H), 3.90–3.93 (m, 1H), 4.01–4.16 (m, 8H), 5.07 (s, 1H), 5.13 (s, 1H), 5.33–5.41 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ -1.3, 14.5, 18.6, 18.7, 18.8, 23.8, 26.3, 26.8, 27.9, 28.1, 28.2, 28.8, 30.1, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.9, 33.1, 33.7, 36.7, 41.1, 47.3, 51.4, 51.8, 57.6, 62.2, 64.0, 64.1, 69.4, 71.8, 73.5, 74.8, 76.7, 82.9, 84.0, 99.2, 99.7, 130.8, 130.9, 158.5, 158.7, 158.9, 160.1, 174.8, 176.8.

*N,N*-Diioleil-suberamide-1,2',3,3''-tetra(trimethylsilyl)-ethylcarbamate-tobramycin (**23b**). Following the procedure described for compound **12**, reaction of amine **11** (117 mg, 0.11 mmol) with acid **22b** (84 mg, 0.12 mmol), in the presence of HBTU (51 mg, 0.13 mmol) and DMAP (42 mg, 0.34 mmol) in DMF (10 mL), provided the expected compound **23b** (98 mg, 51%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.06 (s, 36H), 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.00–1.03 (m, 8H), 1.29–1.39 (m, 49H), 1.51–1.64 (m, 10H), 1.98–2.04 (m, 8H), 2.25–2.30 (m, 2H), 2.33–2.37 (m, 2H), 3.35–3.76 (m, 16H), 3.88–3.93 (m, 1H),

4.08–4.17 (m, 8H), 5.07 (s, 1H), 5.13 (s, 1H), 5.33–5.39 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ –1.3, 14.5, 18.6, 18.7, 23.8, 26.6, 27.0, 27.8, 28.0, 28.2, 28.8, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.8, 30.9, 33.1, 34.0, 36.8, 41.1, 47.2, 51.4, 57.6, 62.2, 64.0, 66.5, 69.4, 71.8, 73.5, 74.8, 76.6, 83.0, 99.3, 99.8, 130.8, 130.9, 158.5, 158.6, 158.8, 160.1, 175.1, 177.1.

*N,N*-Di-*oleyl*-*sebacamide*-1,2',3,3''-*tetra*((*trimethylsilyl*)-*ethyl*carbamate)-*tobramycin* (**23c**). Following the procedure described for compound **12**, reaction of amine **11** (105 mg, 0.10 mmol) with acid **22c** (79 mg, 0.11 mmol), in the presence of HBTU (47 mg, 0.12 mmol) and DMAP (37 mg, 0.30 mmol) in DMF (10 mL), provided the expected compound **23c** (73 mg, 41%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.07 (s, 36H), 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.94–0.98 (m, 8H), 1.25–1.36 (m, 53H), 1.48–1.56 (m, 10H), 1.97–2.10 (m, 8H), 2.20–2.24 (m, 2H), 2.27–2.31 (m, 2H), 3.35–3.76 (m, 16H), 3.88–3.92 (m, 1H), 4.01–4.13 (m, 8H), 5.02 (s, 1H), 5.06 (s, 1H), 5.28–5.35 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ –1.3, 14.5, 18.6, 18.7, 18.8, 23.8, 26.8, 27.1, 27.8, 28.0, 28.2, 28.8, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.7, 30.8, 30.9, 33.1, 33.7, 34.1, 36.9, 41.1, 47.2, 51.4, 57.7, 62.2, 64.0, 66.6, 69.5, 71.8, 73.6, 74.8, 76.6, 83.1, 99.4, 99.9, 130.8, 130.9, 131.0, 158.5, 158.7, 158.9, 160.1, 175.2, 177.3.

*N,N*-Di-*oleyl*-*dithioglycolamide*-1,2',3,3''-*tetra*((*trimethylsilyl*)-*ethyl*carbamate)-*tobramycin* (**23d**). Following the procedure described for compound **12**, reaction of amine **11** (320 mg, 0.31 mmol) with acid **22d** (230 mg, 0.34 mmol), in the presence of HBTU (137 mg, 0.36 mmol) and DMAP (110 mg, 0.90 mmol) in DMF (40 mL), provided the expected compound **23d** (122 mg, 23%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.01 (s, 36H), 0.85 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.94–0.98 (m, 8H), 1.25–1.39 (m, 45H), 1.51–1.64 (m, 6H), 1.90–2.04 (m, 8H), 3.35–3.70 (m, 20H), 3.83–3.90 (m, 1H), 4.07–4.11 (m, 8H), 5.02 (s, 1H), 5.11 (s, 1H), 5.28–5.33 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 25 °C) δ –1.3, 14.5, 18.6, 18.7, 18.8, 23.8, 27.8, 28.0, 28.2, 28.7, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.8, 30.9, 33.1, 33.6, 42.9, 47.7, 51.4, 57.7, 62.2, 64.0, 66.6, 69.5, 71.8, 73.2, 74.8, 76.8, 84.0, 99.2, 99.9, 130.8, 130.9, 158.5, 158.7, 158.9, 160.1, 170.4, 172.3.

*Di-oleyl*-*adipyl*-*tobramycin* (**24a**). Following the procedure described for **13**, treatment of **23a** (150 mg, 0.09 mmol) by TFA (6 mL) in DCM (3 mL) provided **24a** (131 mg, 93%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.92 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H), 1.21–1.39 (m, 45H), 1.48–1.70 (m, 10H), 1.94–2.08 (m, 8H), 2.17–2.23 (m, 1H), 2.25–2.30 (m, 2H), 2.38–2.41 (m, 2H), 2.51–2.57 (m, 1H), 3.31–3.38 (m, 4H), 3.42–3.49 (m, 7H), 3.63–3.70 (m, 1H), 3.71–3.93 (m, 7H), 5.10 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 5.32–5.38 (m, 4H), 5.45 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 25 °C) δ 14.4, 23.7, 26.2, 26.5, 27.8, 28.1, 28.8, 30.1, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.8, 31.1, 33.1, 33.8, 36.6, 40.8, 47.4, 49.8, 50.0, 50.9, 56.7, 58.7, 66.0, 67.6, 69.9, 75.5, 75.9, 81.1, 85.5, 97.0, 101.7, 130.8, 130.9, 174.8, 176.7. HRMS: calculated for C<sub>60</sub>H<sub>114</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub> [M + H]<sup>+</sup> = 1095.8624, found 1095.8629.

*Di-oleyl*-*suberyl*-*tobramycin* (**24b**). Following the procedure described for **13**, treatment of **23b** (98 mg, 0.06 mmol) by TFA (4 mL) in DCM (3 mL) provided **24b** (57 mg, 63%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.29–1.36 (m, 49H), 1.51–1.53 (m, 1H), 1.54–1.72 (m, 9H), 1.95–2.04 (m, 8H), 2.17–2.23 (m, 3H), 2.33–2.37 (m, 2H), 2.48–2.52 (m, 1H), 3.31–3.42 (m, 11H), 3.61–3.92 (m, 8H), 5.08 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.32–5.38 (m, 4H), 5.45 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 25 °C) δ 14.5, 23.7, 26.6, 26.8, 27.8, 28.0, 28.1, 28.7, 29.7, 30.1, 30.2, 30.3, 30.5, 30.6, 30.8, 31.1, 33.1, 34.0, 36.9, 40.8, 47.3, 49.8, 50.0, 50.9, 56.7, 62.0, 65.9, 67.6, 69.9, 75.4, 75.5, 75.6, 81.3, 85.6, 97.1, 101.7, 130.8, 130.9, 175.1, 177.1. HRMS: calculated for C<sub>62</sub>H<sub>119</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub> [M + H]<sup>+</sup> = 1123.8937, found 1123.8940.

*Di-oleyl*-*sebacyl*-*tobramycin* (**24c**). Following the procedure described for **13**, treatment of **23c** (73 mg, 0.04 mmol) by TFA (4 mL) in DCM (3 mL) provided **24c** (52 mg, 77%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.92 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H), 1.29–1.36 (m, 53H), 1.54–1.69 (m, 10H), 1.97–2.06 (m, 8H), 2.15–2.28 (m, 3H), 2.31–2.38 (m, 2H), 2.47–2.55 (m, 1H), 3.31–3.56 (m, 10H), 3.67–3.94 (m, 9H), 5.09 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.35–5.37 (m, 4H), 5.47 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 25 °C) δ 14.5, 23.8, 26.8, 26.9, 27.8, 28.0, 28.1, 28.7, 30.1, 30.2, 30.3, 30.4, 30.6, 30.8, 31.1, 33.1, 34.1, 36.9, 40.8, 49.8, 50.0, 50.9, 56.7, 62.0, 65.9, 67.6, 69.9, 75.4, 75.5, 75.7, 81.3, 85.6, 97.1, 101.7, 130.8, 130.9,

175.2, 177.2. HRMS: calculated for C<sub>64</sub>H<sub>123</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub> [M + H]<sup>+</sup> = 1151.9250, found 1151.9252.

*Di-oleyl*-*dithioglycolyl*-*tobramycin* (**24d**). Following the procedure described for **13**, treatment of **23d** (116 mg, 0.07 mmol) by TFA (6 mL) in DCM (3 mL) provided **24d** (78 mg, 73%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.23–1.34 (m, 45H), 1.52–1.69 (m, 6H), 1.95–2.03 (m, 8H), 2.20–2.23 (m, 1H), 2.47–2.54 (m, 1H), 3.31–3.37 (m, 6H), 3.46–3.68 (m, 7H), 3.73–3.93 (m, 10H), 5.08 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.35–5.38 (m, 4H), 5.46 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 25 °C) δ 14.5, 23.8, 26.1, 27.8, 28.0, 28.1, 28.6, 30.1, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.8, 31.3, 33.1, 33.6, 34.7, 41.4, 42.0, 42.8, 47.7, 51.0, 56.7, 62.0, 66.1, 67.6, 69.9, 75.5, 75.6, 85.7, 97.0, 101.7, 130.8, 130.9, 170.4, 172.1. HRMS: calculated for C<sub>58</sub>H<sub>110</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> = 1131.7786, found 1131.779.

2-((*tert*-*Butoxycarbonyl*)amino)propane-1,3-diyl *Di-oleate* (**26**). *N*-*Boc*-serinol **25** (500 mg, 2.61 mmol, 1 equiv) was dissolved in CHCl<sub>3</sub> (30 mL). Pyridine (0.63 mL, 7.84 mmol, 3 equiv) and oleoyl chloride (1.73 mL, 5.23 mmol, 2 equiv) were successively added and the mixture stirred at rt overnight. The mixture was then washed with NH<sub>4</sub>Cl<sub>sat</sub>, H<sub>2</sub>O, and brine. The organic fraction was dried over MgSO<sub>4</sub> before purification by flash chromatography (DCM/MeOH), providing **26** (1.55 g, 88%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.19–1.34 (m, 40H), 1.45 (s, 9H), 1.56–1.63 (m, 4H), 1.98–2.05 (m, 8H), 2.31 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H), 4.05–4.20 (m, 5H), 4.76–4.78 (bs, 1H), 5.30–5.37 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 14.0, 23.7, 26.0, 28.1, 28.8, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.8, 30.9, 33.1, 34.9, 50.1, 64.1, 80.5, 130.8, 130.9, 157.9, 175.0.

2-*Aminopropane*-1,3-diyl*di-oleate* *Trifluoroacetate* Salt (**27**). To a solution of **26** (1.55 g, 2.15 mmol) in DCM (20 mL) was added TFA (2 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 1 h at 0 °C and 2 h at rt, then concentrated. After three coevaporations with MeOH, the residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH) to provide **27** (1.11 g, 70%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H), 1.18–1.37 (m, 40H), 1.57–1.60 (m, 4H), 1.97–2.02 (m, 8H), 2.34 (t, *J* = 7.2 Hz), 3.73 (bs, 1H), 4.25–4.32 (m, 2H), 4.35–4.42 (m, 2H), 5.32–5.45 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 14.1, 23.7, 25.8, 28.1, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.8, 33.1, 34.5, 50.7, 62.2, 130.8, 130.9, 174.4.

4-((1,3-*Bis*(*oleoyloxy*)propan-2-yl)amino)-4-*oxobutanoic* Acid (**28**). To a solution of **27** (1.11 g, 1.51 mmol, 1 equiv) in DCM (50 mL) were successively added succinic anhydride (0.358 g, 3.58 mmol, 2 equiv) and Et<sub>3</sub>N (1 mL, 7.16 mmol, 4 equiv). The mixture was stirred at rt overnight, then quenched by addition of HCl 1M. After extraction, the organic layer was further washed with 1 M HCl and water (three times), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH) to afford the desired acid **28** (1.01 g, 92%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.24–1.38 (m, 40H), 1.58–1.62 (m, 4H), 2.00–2.03 (m, 8H), 2.34 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H), 2.48 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.57 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.06–4.17 (m, 4H), 4.33–4.36 (m, 1H), 5.28–5.38 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) δ 14.5, 23.8, 26.0, 28.2, 29.9, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.8, 31.6, 32.7, 33.1, 34.9, 52.2, 63.7, 130.8, 130.9, 147.6, 175.0, 176.2.

2-(4-(1',2',3',3''-*Tetra*((*trimethylsilyl*)ethylcarbamate)-*tobramycin*-amino)-4-*oxobutanamido*)propane-1,3-diyl*di-oleate* (**29**). Following the procedure described for compound **12**, reaction of amine **11** (141 mg, 0.13 mmol) with acid **28** (107 mg, 0.15 mmol), in the presence of HBTU (61 mg, 0.16 mmol) and DMAP (49 mg, 0.40 mmol) in DMF (40 mL), provided the expected compound **29** (182 mg, 80%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C) δ 0.04–0.05 (m, 36H), 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H), 0.99–1.03 (m, 8H), 1.26–1.38 (m, 41H), 1.55–1.69 (m, 6H), 1.93–2.12 (m, 9H), 2.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H), 2.54 (s, 4H), 3.32–3.80 (m, 15H), 3.90–3.93 (m, 1H), 4.03–4.25 (m, 12H), 4.37–4.40 (m, 1H), 5.07 (s, 1H), 5.18 (s, 1H), 5.32–5.39 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 25 °C) δ –1.4, 14.5, 18.6, 18.7, 18.8, 23.7, 26.0, 28.1, 30.2, 30.3, 30.4, 30.6, 30.8, 31.9, 33.1, 34.2, 34.9, 41.4, 47.9, 51.3, 51.6, 57.7, 62.2, 63.6, 64.0, 64.2, 66.9, 69.4, 71.8, 73.5, 74.8, 76.9, 82.4, 98.8, 99.8, 130.8, 130.9, 158.5, 158.8, 160.1, 174.6, 175.0, 175.2.

*Di-oleyl*-*succinyl*-*serinyl*-*tobramycin* (**30**). Following the procedure described for **13**, treatment of **29** (180 mg, 0.10 mmol) by TFA (6 mL) in DCM (3 mL) provided **30** (125 mg, 75%). <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 25 °C)



$\delta$  0.85 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6H), 1.19–1.32 (m, 41H), 1.51–1.60 (m, 4H), 1.88–2.03 (m, 9H), 2.09–2.18 (m, 1H), 2.31 (t,  $J = 7.2$  Hz, 4H), 2.45–2.53 (m, 4H), 3.32–3.52 (m, 7H), 3.58–3.65 (m, 2H), 3.67–3.89 (m, 8H), 4.09 (m, 4H), 4.24–4.30 (m, 1H), 5.04 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 5.28–5.31 (m, 4H), 5.37 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD, 25 °C)  $\delta$  14.5, 23.7, 26.0, 28.2, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.8, 31.1, 31.4, 31.7, 33.1, 34.9, 41.0, 49.8, 50.3, 51.0, 51.5, 56.7, 62.0, 63.5, 66.0, 67.6, 70.0, 75.5, 76.1, 96.9, 101.7, 130.8, 130.9, 175.0, 175.2. HRMS: calculated for  $\text{C}_{61}\text{H}_{113}\text{N}_6\text{O}_{15}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  = 1169.8264, found 1169.8269.

**Preparation of Complexes Solution.** Formulations of nucleic acids with lipids were prepared as previously described.<sup>31</sup> Briefly, equal volume of nucleic acids (0.5  $\mu\text{g}$  for DNA and mRNA and 0.15  $\mu\text{g}$  or 0.3  $\mu\text{g}$  for siRNA) was mixed with lipids, at a charge ratio ( $\pm$ ) of 5 for *in vitro* transfection or at a charge ratio ranging from 0.1 to 6 for physicochemical characterization.

**Physico-Chemical Characterization.** The size distribution as a function of the charge ratio of lipoplexes was measured by dynamic light scattering using a Zeta-Sizer Nano Series Nano ZS-90 (Malvern). Complexes (100  $\mu\text{L}$ ) were made by mixing 1  $\mu\text{g}$  of DNA and ionizable lipids, in NaCl 150 mM final concentration at different charge ratios ranged from 0.1 to 6. The particles with a size over 700 nm were considered as colloidally unstable. Ethidium bromide fluorescence measurements and retardation assays were performed as described.<sup>31</sup>

**Nucleic Acids.** pGWIZ-Luc (Genlantis) is a plasmid encoding the luciferase reporter gene under the control of the human cytomegalovirus immediate-early gene promoter. pGWIZ-eGFP (Clontech) is a plasmid encoding green fluorescent protein reporter gene, under the control of the human cytomegalovirus immediate-early gene promoter. Plasmids were purified from recombinant *Escherichia coli* by means of Endofree plasmid purification columns (Qiagen). mRNA encoding the luciferase and the green fluorescent protein was purchased from Trilink.

Human anti-lamin A/C siRNA (sc-35776) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, and murine anti-lamin A/C siRNA (sense sequence: GGA-CCU-CGA-GGC-UCU-UCU-C) was obtained from Eurogentec.

**Cell and Culture Conditions.** The transfection activity of the various vectors was evaluated in transient transfection experiments with three different cell types. HeLa and C2C12 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with a glucose concentration of 4.5 g/L, supplemented with 10% fetal calf serum, 1% of L-glutamine, and 1% of antibiotics (penicillin/streptomycin).

Primary cells as in rat aorta smooth muscle cells were provided by Nathalie Vaillant from the Institut du Thorax, in Nantes. Rat aorta smooth muscle cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with a glucose concentration of 1 g/L, supplemented with 10% fetal calf serum, 1% of L-glutamine, and 1% of antibiotics (penicillin/streptomycin). Human fibroblasts were provided by Caroline Chariou and Laurent David from the Nantes iPSC core facility. The medium used was Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with a glucose concentration of 4.5 g/L, with Glutamax, supplemented with HyClone Fetal Bovine Serum 10%, MEM Non-Essential Amino Acids 1%, and Sodium Pyruvate 1%.

All cells were routinely maintained at 37 °C in a humidified 5%  $\text{CO}_2$ /95% air containing atmosphere.

**In Vitro Cell Transfection Assay.** Twenty-four hours prior to transfection cells were seeded in 24-well culture plates at a density of 55 000 cells per well for HeLa and for rat aorta smooth muscle cells and 31 000 cells per well for Human fibroblasts, in 1 mL of complete medium and incubated at 37 °C in a humidified 5%  $\text{CO}_2$ /95% air containing atmosphere.

Thirty minutes before transfection, medium was removed and replaced by 400  $\mu\text{L}$  of fresh complete medium. One hundred microliters of lipoplexes was prepared by mixing two equal solutions containing the nucleic acids (0.5  $\mu\text{g}$  for DNA and mRNA and 0.15  $\mu\text{g}$  or 0.3  $\mu\text{g}$  for siRNA) and the ionizable lipid at a charge ratios ( $\pm$ ) of 5.

**Luciferase Assay.** After 24 h of incubation at 37 °C, 5% humidified  $\text{CO}_2$ , cells were washed with PBS and lysed in Reporter Lysis Buffer 1 $\times$  (Promega) supplemented with 1 tablet per 50 mL of complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Sciences) according to manufacturer's recommendations. After overnight freezing cycle, cell

lysates were centrifuged at 10 000 rpm during 5 min. Luciferase activity was measured on an aliquot of supernatant using the Luciferase Assay System kit (Promega) according to manufacturer's recommendations. Luminescence was recorded on a Victor X-3 multilabel plate reader (PerkinElmer). All measurements were performed in duplicate.

**Microscopy.** For fluorescence observation, rat aorta muscle cells were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Then, slides were mounted with Prolong Gold Antifading Reagent with DAPI (Life Technologies) and incubated for 24 h at room temperature before observation under a Zeiss Axiovert 200 microscope with an apotome unit and using appropriate filters. Images were treated using ImageJ 1.42q software.

**Gene Silencing Experiments.** For gene silencing experiment, cells were washed after 24 h of incubation, lysed using the NucleoSpin RNA/Protein assay (Macherey Nagel) to purify RNA, and quantified with NanoDrop 1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). RT-qPCR were then realized in two phases. First, reverse transcriptions of RNA in cDNA were conducted using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Life Technologies) on GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler (Life Technologies). Then, the expression of lamin A/C and HPRT was quantified by Real-Time PCR using Taqman Gene expression assays on StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies). Results were normalized against the expression levels of endogenous HPRT and expressed according to the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  formula. Probes used to amplify specific gene products from human or murine cDNA (Life technologies) were Hs00153462\_m1 for human lamin A/C, Hs99999909\_m1 for human HPRT, Mm00497783\_m1 for murine lamin A/C, and Mm00446966\_m1 for murine HPRT.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01679.

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of final compounds and head-to-head data with commercial Lipofectamine 3000 (PDF) SMILES data (XLSX)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: bruno.pitard@incellart.com. Phone: (+33) 2 40 71 67 17.

### Author Contributions

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful to Caroline Chariou and Laurent David from Nantes iPSC core facility for their technical assistance for human fibroblast experiments and to Nathalie Vaillant for providing rat aorta smooth muscle cells. We are also indebted to P. Lehn and J.-M. Lehn for their pioneer works related to the synthesis of cationic lipids used in this study and for their stimulating discussions and constant interest in this work. We also thank S. Fukuyama for fruitful discussions throughout this study. The authors thank Marion Decossas for assistance with cryoTEM. This work was supported by special grants from BPI France Financement (Paris, France) for EMERIT project and from Région Pays de la Loire for HEPAVAC project. T.C. and L.D. are supported by funds from IHU-Cesti (French government financial support managed by the National Research Agency "Investment Into The Future" program ANR-10-IBHU-005, cosupported by Région Pays de la Loire and Nantes Métropole).

### ■ ABBREVIATIONS USED

C2C12, mouse myoblast cell line; DMAP, 4-(dimethylamino)-pyridine; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMST, di-myristyl-succinyl-tobramycin; DOAT, di-oleyl-adipyl-tobramycin; DODT, di-oleyl-dithioglycolyl-tobramycin; DOSET, di-oleyl-sebacyl-tobramycin; DOSUT, di-oleyl-suberyl-tobramycin; DOSST, di-oleyl-succinyl-serinyl-tobramycin; DOST, di-oleyl-succinyl tobramycin; DPST, di-palmityl-succinyl-tobramycin; DSST, di-stearyl-succinyl-tobramycin; EDC, *N*-(3-(dimethylamino)propyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride; eGFP, enhanced green fluorescent protein; HBTU, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate; HeLa, human cervical cancer derived cells; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; MEM, minimum essential medium; qRT-PCR, quantitative real-time PCR; RNAi, RNA interference; siRNA, small interfering RNA; SEM, standard error of mean

### ■ REFERENCES

- (1) Sahin, U.; Kariko, K.; Türeci, O. mRNA based therapeutics: developing a new class of drugs. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2014**, *13*, 759–780.
- (2) Geall, A. J.; Mandl, C. W.; Ulmer, J. B. RNA: the new revolution in nucleic acid vaccines. *Semin. Immunol.* **2013**, *25*, 152–159.
- (3) Whitehead, K. A.; Langer, R.; Anderson, D. A. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 129–138.
- (4) Resnier, P.; Montier, T.; Mathieu, V.; Benoit, J. P.; Passirani, C. A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer. *Biomaterials* **2013**, *34*, 6429–6443.
- (5) Mulligan, R. C. The basic science of gene therapy. *Science* **1993**, *260*, 926–932.
- (6) Anderson, W. F. Human gene therapy. *Nature* **1998**, *392*, 25–30.
- (7) Ibraheem, D.; Elaissari, A.; Fessi, H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int. J. Pharm.* **2014**, *459*, 70–83.
- (8) Walther, W.; Stein, U. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* **2000**, *60*, 249–271.
- (9) Waehler, R.; Russell, S. J.; Curiel, D. T. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 573–587.
- (10) Warnock, J. N.; Daigne, C.; Al-Rubeai, M. Introduction to viral vectors. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *737*, 1–25.
- (11) Vannucci, L.; Lai, M.; Chiappesi, F.; Ceccherini-Nelli, L.; Pistello, M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* **2013**, *36*, 1–22.
- (12) Mintzer, M. A.; Simanek, E. E. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259–302.
- (13) Guo, X.; Huang, L. Recent Advances in Non-viral Vectors for Gene Delivery. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 971–979.
- (14) Junquera, E.; Aicart, E. Cationic lipids as transfecting agents of DNA in gene therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 649–663.
- (15) Junquera, E.; Aicart, E. Recent progress in gene therapy to deliver nucleic acids with multivalent cationic vectors. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, DOI: 10.1016/j.cis.2015.07.003.
- (16) Yin, H.; Kanasty, R. L.; Eltoukhy, A. A.; Vegas, A. J.; Dorkin, J. R.; Anderson, D. G. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 541–555.
- (17) Zhi, D.; Zhang, S.; Cui, S.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Zhao, D. The headgroup evolution of cationic lipids for gene delivery. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 487–519.
- (18) Zhi, D.; Zhang, S.; Wang, B.; Zhao, Y.; Yang, B.; Yu, S. Transfection efficiency of cationic lipids with different hydrophobic domains in gene delivery. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 563–577.
- (19) Draghici, B.; Iliés, M. A. Synthetic nucleic acid delivery systems: present and perspectives. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4091–4130.
- (20) Wan, Y.; Moyle, P. M.; Toth, I. Endosome escape strategies for improving the efficacy of oligonucleotide delivery systems. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 3326–3346.
- (21) Varkouhi, A. K.; Scholte, M.; Storm, G.; Haisma, H. J. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Controlled Release* **2011**, *151*, 220–228.
- (22) Gilleron, J.; Querbes, W.; Zeigerer, A.; Borodovsky, A.; Marsico, G.; Schubert, U.; Manygoats, K.; Seifert, S.; Andree, C.; Stöter, M.; Epstein-Barash, H.; Zhang, L.; Koteliansky, V.; Fitzgerald, K.; Fava, E.; Bickle, M.; Kalaidzidis, Y.; Akinc, A.; Maier, M.; Zerial, M. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 638–650.
- (23) Gujrati, M.; Malamas, A.; Shin, T.; Jin, E.; Sun, Y.; Lu, Z. R. Multifunctional cationic lipid-based nanoparticles facilitate endosomal escape and reduction-triggered cytosolic siRNA release. *Mol. Pharmaceutics* **2014**, *11*, 2734–2744.
- (24) Hafez, I. M.; Maurer, N.; Cullis, P. R. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther.* **2001**, *8*, 1188–1196.
- (25) Xu, Y.; Czoka, F. C. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616–5623.
- (26) Le Bihan, O.; Chèvre, R.; Mornet, S.; Garnier, B.; Pitard, B.; Lambert, O. Probing the in vitro mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1595–1609.
- (27) Belmont, P.; Aissaoui, A.; Hauchecorne, M.; Oudrhiri, N.; Petit, L.; Vigneron, J. P.; Lehn, J. M.; Lehn, P. Aminoglycoside-derived cationic lipids as efficient vectors for gene transfection *in vitro* and *in vivo*. *J. Gene Med.* **2002**, *4*, 517–526.
- (28) Sainlos, M.; Belmont, P.; Vigneron, J. P.; Lehn, P.; Lehn, J. M. Aminoglycoside-derived cationic lipids for gene transfection: Synthesis of kanamycin A derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *15*, 2764–2774.
- (29) Sainlos, M.; Hauchecorne, M.; Oudrhiri, N.; Zertal-Zidani, S.; Aissaoui, A.; Vigneron, J. P.; Lehn, J. M.; Lehn, P. Kanamycin A-derived cationic lipids as vectors for gene transfection. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1023–1033.
- (30) Mevel, M.; Sainlos, M.; Chatin, B.; Oudrhiri, N.; Hauchecorne, M.; Lambert, O.; Vigneron, J. P.; Lehn, P.; Pitard, B.; Lehn, J. M. Paromomycin and neomycin B derived cationic lipids: synthesis and transfection studies. *J. Controlled Release* **2012**, *158*, 461–469.
- (31) Desigaux, L.; Sainlos, M.; Lambert, O.; Chevre, R.; Letrou-Bonneval, E.; Vigneron, J. P.; Lehn, P.; Lehn, J. M.; Pitard, B. Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16534–16539.
- (32) Hendrix, M.; Priestley, E. S.; Joyce, G. F.; Wong, C. H. Direct observation of aminoglycoside-RNA interactions by surface plasmon resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3641–3648.
- (33) Thomas, J. R.; Hergenrother, P. J. Targeting RNA with small molecules. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1171–1224.
- (34) Elouahabi, E.; Ruyschaert, J. M. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol. Ther.* **2005**, *11*, 336–347.
- (35) Martin, B.; Sainlos, M.; Aissaoui, A.; Oudrhiri, N.; Hauchecorne, N.; Vigneron, J. P.; Lehn, J. M.; Lehn, P. The design of cationic lipids for gene delivery. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 375–394.
- (36) Wetzler, B.; Byk, G.; Frederic, M.; Airiau, M.; Blanche, F.; Pitard, P.; Scherman, D. Reducible cationic lipids for gene transfer. *Biochem. J.* **2001**, *356*, 747.
- (37) Lv, H.; Zhang, S. B.; Wang, B.; Cui, S. H.; Yan, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 100–109.
- (38) Tang, F.; Hughes, J. A. Introduction of a disulfide bond into a cationic lipid enhances transgene expression of plasmid DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *242*, 141–145.
- (39) Shirazi, R. S.; Ewert, K. K.; Leal, C.; Majzoub, R. N.; Boussein, N. F.; Safinya, C. R. Synthesis and characterization of degradable multivalent cationic lipids with disulfide bond spacer for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, *1808*, 2156–2166.
- (40) Streicher, W.; Loibner, H.; Hildebrandt, J.; Turnowsky, F. Synthesis and structure/activity relationships of new guanidino

derivatives of aminoglycoside antibiotics. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1983**, *9*, 591–598.

(41) Leventis, R.; Silviu, J. R. Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1990**, *1023*, 124–132.

(42) Behr, J. P. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 382–389.

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

(44) Khalil, I. A.; Kogure, K.; Akita, H.; Harashima, H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 32–45.

(45) Baichao, M.; Shubiao, Z.; Huiming, J.; Budiao, Z.; Hongtao, L. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *J. Controlled Release* **2007**, *123*, 184–194.

(46) Wasungu, L.; Hoekstra, D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J. Controlled Release* **2006**, *116*, 255–264.

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

(48) Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **2004**, *377*, 159–169.





### Combinaison des bras espaceurs (amide et phosphoramide)

Dans l'article deux, nous avons comparé deux systèmes de formulations différents fabriqués avec le même lipide cationique dont la structure était composée d'un groupement de tête paromomycine, d'un squelette de dioléyl et d'un bras espaceur avec une liaison amide (**DOSP** ou **CLN**). Nous avons étudié l'association de ce lipide cationique **DOSP (CLN)** avec un colipide possédant :

- un bras espaceur amide (composé **5** et **6** dans l'article ou **HLN**) conduisant aux liposomes homogènes (**CLN : HLN**) (Figure 43).
- un bras espaceur phosphoramide (composé **MM27** ou **HLP**) conduisant aux liposomes hybrides (**CLN : HLP**) (Figure 43).

Nous avons cherché à savoir s'il était préférable pour la stabilité des complexes avec l'ADN et pour l'amélioration de l'efficacité de transfection génique d'avoir des liposomes homogènes ou hybrides.

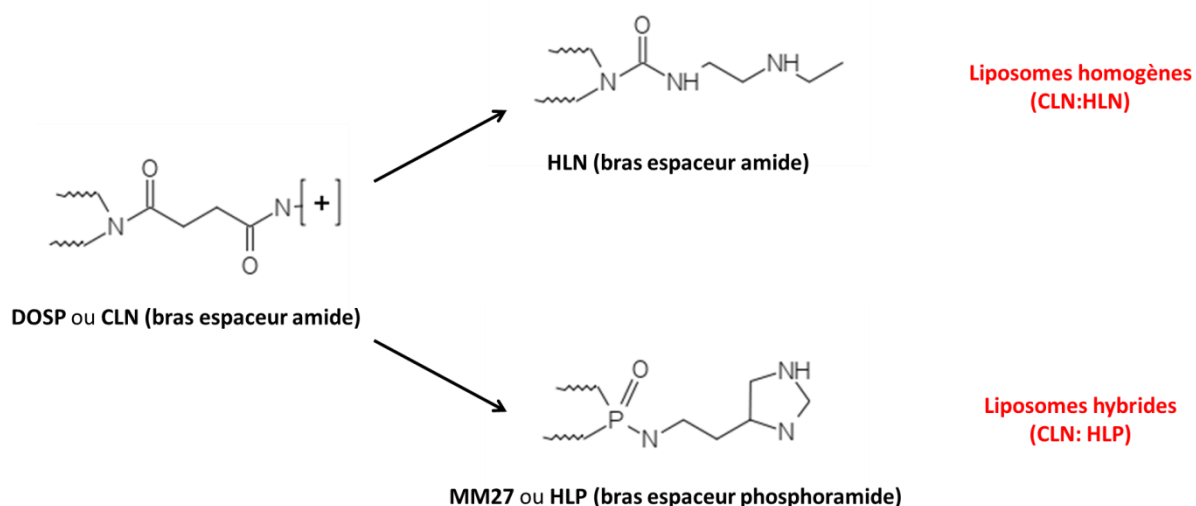


Figure 43 : Structures des liposomes homogènes et hybrides

Pour mettre en évidence l'importance du bras espaceur entre les deux chaînes acyliques présentes dans la structure des colipides, nous avons comparé l'efficacité de transfection de deux types de liposomes dans les lignées cellulaires (lignée cellulaire rénale et lignée cellulaire musculaire), ainsi que dans des cellules primaires (cardiomyocytes/hépatocytes).

J'ai participé à ces travaux en caractérisant la structure morphologique des complexes des deux meilleurs composés : **DOSP/MM27** (liposomes hybrides) et **DOSP/6** (liposomes homogènes) par cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM).

Pour les liposomes hybrides (**DOSP/MM27** ou **CLN : HLP**) :

En présence d'ADN, **DOSP/MM27** forme de larges assemblages (>1 $\mu$ m). Ces structures ont révélé des empilements de couches lipidiques séparées par des brins d'ADN, montrant que les molécules d'ADN étaient étroitement liées à la membrane lipidique. La mesure de la cinétique de décomplexation à différents pH allant de 5,26 à 7,1 a montré que le signal fluorescent des complexes **DOSP/MM27-ADN** est faible et il est pratiquement le même en présence de polyphosphates, indiquant que les complexes d'ADN sont stables. Le liposome hybride **DOSP/MM27** conduit à une haute expression du transgène et à un haut pourcentage de cellules transfectées avec une faible toxicité.

Pour les liposomes homogènes (**DOSP/6** ou **CLN : HLN**) :

**DOSP/6** non complexé avec l'ADN est sous forme de liposomes unilamellaires plus petits que **DOSP/MM27** (50-500nm). Dans les assemblages formés avec **DOSP/6**, l'ADN plasmidique ne semble pas être densément compacté. Des empilements de couches de lipides et d'ADN sont à peine visibles et des liposomes intacts sont présents, suggérant que les molécules d'ADN sont lâchement liées au liposome. Des brins d'ADN sont visibles au voisinage des assemblages. A différents pH allant de 5,26 à 7,1 le signal fluorescent pour les complexes **DOSP/6-ADN** est de 80%, ce qui indique que les complexes d'ADN ne sont pas stables. La présence des colipides **5** ou **6** formulés avec **DOSP** n'a pas augmenté l'efficacité de transfection par rapport à **MM27**.

Conclusion : Une meilleure stabilité et une transfection d'ADN plus élevée ont été obtenues avec les liposomes hybrides (**CLN : HLP**) comparés aux liposomes homogènes (**CLN : HLN**). En effet, **CLN : HLP** conduit à une complexation d'ADN étroite par rapport à celle observée avec **CLN : HLN**. La membrane lipidique hybride (**CLN : HLP**) conduit à des lipoplexes avec plus de résistance à la complexation de l'ADN au pH physiologique extracellulaire. L'utilisation de liposomes hybrides (**CLN : HLP**) augmente le nombre de cellules transfectées, probablement en raison de leur stabilité accrue. Ces résultats soulignent l'importance du bras espaceur

dans la structure du squelette du colipide, qui impacte directement sur l'activité de transfection. L'utilisation du squelette hydrophobe dioléylphosphoramide du colipide **MM27** associé au lipide cationique **DOSP**, conduisant à des liposomes avec un bras espaceur dioléyl hybride (**CLN : HLP**), est démontrée comme la combinaison optimale à utiliser pour la transfection *in vitro* efficace des lignées cellulaires adhérentes ou des cellules primaires.

**L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de la publication suivante dans la revue Journal of Gene Medicine.**



See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/283899133>

# Important role of phosphoramido linkage in imidazole-based dioleoyl helper lipids for liposome stability and primary cell...

Article in *The Journal of Gene Medicine* · October 2015

DOI: 10.1002/jgm.2869

CITATIONS

2

READS

15

12 authors, including:



**Mathieu Mevel**

University of Nantes

33 PUBLICATIONS 407 CITATIONS

SEE PROFILE



**Thomas Haudebourg**

French Institute of Health and Medical Resea...

16 PUBLICATIONS 162 CITATIONS

SEE PROFILE



**Thibault Colombani**

University of Nantes

4 PUBLICATIONS 6 CITATIONS

SEE PROFILE



**Berchel Mathieu**

Université de Bretagne Occidentale

49 PUBLICATIONS 429 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Non viral gene delivery systems [View project](#)

All content following this page was uploaded by [Mathieu Mevel](#) on 11 April 2016.

The user has requested enhancement of the downloaded file. All in-text references [underlined in blue](#) are linked to publications on ResearchGate, letting you access and read them immediately.

# Important role of phosphoramido linkage in imidazole-based dioleoyl helper lipids for liposome stability and primary cell transfection

Mathieu Mével<sup>1,2†</sup>  
 Thomas Haudebourg<sup>1,2†</sup>  
 Thibault Colombani<sup>1,2</sup>  
 Pauline Peuziat<sup>1,2</sup>  
 Laurence Dallet<sup>1,2,3</sup>  
 Benoît Chatin<sup>1,2</sup>  
 Olivier Lambert<sup>3</sup>  
 Mathieu Berchel<sup>4</sup>  
 Tristan Montier<sup>5,6</sup>  
 Paul-Alain Jaffrès<sup>4</sup>  
 Pierre Lehn<sup>5</sup>  
 Bruno Pitard<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Unité INSERM UMR 1087, CNRS UMR 6291, Nantes, France

<sup>2</sup>Université de Nantes, l'institut du thorax, Nantes, France

<sup>3</sup>CBMN UMR-CNRS 5248 IECB, Université de Bordeaux 1-IPB, Pessac, France

<sup>4</sup>UMR CNRS 6521, IFR 148 ScInBioS, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, Brest, France

<sup>5</sup>Unité INSERM 1078, IFR 148 ScInBioS, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, Brest Cedex, France

<sup>6</sup>Service de Génétique Moléculaire et d'histocompatibilité, CHUR, Brest, France

\*Correspondence to: B. Pitard, INCELL-ART, 21 rue La Noue Bras de Fer, 44200 Nantes, France.

E-mail: bruno.pitard@incellart.com

†These authors contributed equally to this work.

Received: 4 September 2015

Revised: 28 October 2015

Accepted: 29 October 2015

## Abstract

**Background** To optimize synthetic gene delivery systems, there is a need to develop more efficient lipid formulations. Most cationic lipid formulations contain 'helper' neutral lipids because of their ability to increase DNA delivery, in particular by improving endosomal escape of DNA molecules via the pH-buffering effect of protonatable groups and/or fusion with the lipid bilayer of endosomes.

**Methods** We evaluated the influence of the linker structure between the two oleyl chains in the helper lipid on transfection efficiency in cell lines, as well as in primary cells (hepatocytes/cardiomyocytes). We reported the synthesis of two new pH-buffering imidazole helper lipids characterized by a polar headgroup containing one (compound **6**) or two (compound **5**) imidazole groups and two oleyl chains linked by an amide group. We studied their association with the aminoglycoside lipidic derivative dioleoylsuccinylparomomycin (DOSP), which contains two oleyl chains linked to the aminoglycoside polar headgroup via an amide function. We compared the morphology and transfection properties of such binary liposomes of DOSP/**5** and DOSP/**6** with those of liposomes combining DOSP with another imidazole-based dioleoyl helper lipid (MM27) in which a phosphoramido group acts as a linker between the two oleyl chains and imidazole function.

**Results** The phosphoramido linker in the helper lipid induces a major difference in terms of morphology and resistance to decomplexation at physical pH for DOSP/helper lipid complexes.

**Conclusions** This hybrid dioleoyl linker composition of DOSP/MM27 led to higher transfection efficiency in cell lines and in primary cells compared to complexes with homogeneous dioleoyl linker. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords** helper lipid; liposome; non viral vector; primary cell; transfection

## Introduction

Developing new, highly efficient and nontoxic gene delivery systems remains an important challenge for both basic and clinical research. Indeed, cationic lipids and polymers have been used routinely ever since Felgner *et al.* [1]

and Wu *et al.* [2] demonstrated their capacities to deliver nucleic acid *in vitro*. Most cationic liposome systems for nucleic acid delivery are based on the formulation of a cationic lipid with a neutral helper lipid such as dioleoylphosphatidyl-choline (DOPC) [3], dioleoyl-L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine (DOPE) [4] or cholesterol [5]. The formation of lipoplexes that results from the association of preformed cationic liposomes and DNA molecules is mainly driven by electrostatic interactions between the positive charges of the cationic lipid headgroups and the negative phosphate groups along the DNA molecules. This interaction determines both the characteristics and the transfection potential of lipoplexes. The structure of lipoplexes formed from various cationic lipids and DNA were extensively analysed by cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) and showed ordered multilamellar particles characterized by an even spacing [6,7].

Lipoplexes are internalized within cells via endocytosis and thus trapped in the endosomes without access to the cytosol and subsequently to the nucleus. Therefore, escape of lipoplexes from endosomes is essential for efficient gene transfection [8] and needs to occur rapidly to avoid the subsequent degradation of DNA by specific enzymes in lysosomes. To allow endosomal escape, the use of a helper lipid in the cationic lipid formulation remains the preferred and most investigated strategy.

The neutral helper lipid DOPE, a natural fusogenic lipid, has been extensively used in cationic liposome formulations [9]. It has been proposed that DOPE may promote fusion with the endosomal membrane allowing thereby release of the DNA into the cytoplasm, and improvement of its intracellular trafficking [10]. However, DOPE has limited utility *in vivo* because its high fusogenic nature, which helps to promote transfection *in vitro*, renders lipoplexes too unstable with respect to aggregation in the more complex *in vivo* environment [11].

The suggested proton-sponge effect has been used recently to design two lipophosphoramidate helper lipids, MM27 and MM37, which are derivatives from histamine or histidine, respectively [12–15]. It was shown that the use of these helper lipids enhances transfection levels by up to 100-fold compared to formulation with DOPE.

Such an effect can be explained by two factors: (i) these helper lipids have strong proton absorbing capabilities as a result of their imidazole rings ( $pK_a$  of approximately 6). Indeed, because of their low  $pK_a$  value, imidazole rings should be unprotonated at pH 7 prior to lipoplex entry into cells and become protonated post-endocytosis when the endosomal compartments are acidified to pH 5.5. This phenomenon leads to chloride accumulation, organelle swelling and eventual endosomolysis by an osmotic shock type mechanism, finally allowing the release of DNA. (ii) MM27-based formulations were more fusogenic at pH 6 than at pH 7.4. This property contributes

to destabilize the endosomal membrane. The development of fusogenic lipids or helper lipids constitutes a strategy that was reported previously [16–18].

Over recent years, we have directed our research efforts towards the development of a novel family of cationic lipids characterized by cationic headgroups consisting of aminoglycosides [19–22]. We reasoned that aminoglycosides should constitute cationic moieties of great interest because of their natural affinity for nucleic acids, as well as their structural variety and multifunctionality [23–25]. Our previous studies clearly demonstrated the feasibility of using an aminoglycoside as headgroup of a cationic lipid and validated our approach. The lipidic aminoglycoside derivative of paromomycin, termed DOSP and bearing an aminoglycoside as polar headgroup and a dioleoylamino hydrophobic backbone, was indeed found to be efficient for gene transfection of various cell lines *in vitro*.

The MM27 imidazole-based helper lipid has been associated in different studies with monocationic lipophosphoramidates, displaying different polar heads but sharing the same phosphoramido linker between the two hydrophobic oleyl chains, leading to liposomes with a homogeneous dioleoyl linker [12,26,27]. In all of these studies, the results showed that using MM27 enhanced transfection levels were obtained in most cases. Nevertheless, the efficiency of MM27 with a polycationic lipid having a different linker between the two oleyl chains and the polar head remains to be demonstrated for DNA transfection in particular on primary cells.

Therefore, we investigated whether associating the cationic lipid DOSP with an imidazole-based helper lipid displaying (i) a similar amido linker between the oleyl chains, leading to liposomes with a homogeneous dioleoyl linker, or (ii) a phosphoramido linker as in MM27, leading to liposomes with a hybrid dioleoyl linker, would be preferable for the stability of complexes with DNA and for the enhancement of gene transfection efficiency.

In the present study, we describe the synthesis and use of such imidazole-based helper lipids having an amido or phosphoramido linker. Furthermore, we also characterized the DNA complexation and transfection properties of the polycationic lipid DOSP when formulated with these helper lipids using not only cell lines, but also primary cells.

## Materials and methods

All reagents were purchased from Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) or Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and were used without further purification. Reactions requiring anhydrous conditions were performed under nitrogen. Column chromatographies



were conducted on silica gel Kieselgel SI60 (40–63  $\mu\text{m}$ ) obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Dichloromethane was distilled from calcium hydride under argon prior to use. Triethylamine was dried and distilled over KOH. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded at room temperature with a Bruker AC 300 spectrometer at 300 MHz ( $^1\text{H}$ ), 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) or with an AVANCE 400 MHz at 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) and 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) (Bruker Instruments, Inc., Billerica, MA, USA). Chemical shifts are reported in parts per million (p.p.m.); coupling constants are reported in units of Hertz (Hz) (s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; quin, quintet; br, broad singlet). When needed,  $^{13}\text{C}$  heteronuclear multiple-quantum correlation (HMQC) and heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) were used to unambiguously establish structures. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded with a hybrid LTQ-orbitrap spectrometer (ESI<sup>+</sup>) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and with a Autoflex III SmartBeam spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) (MALDI). Lipofectamine was obtained from Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA).

The synthesis of dioleylamine (**1**) has been reported previously [21].

## Synthesis

*General procedure for the synthesis of the amino amphiphiles*  
Dioleylamine (200 mg, 0.39 mmol) was dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , then triphosgene (115 mg, 0.39 mmol) was added at 0°C under a nitrogen atmosphere followed by the addition of dry  $\text{NEt}_3$  (270  $\mu\text{l}$ , 1.95 mmol). The reaction was stirred 30 min at 0°C and 90 min at 20°C. The formation of the carbamoylchloride was confirmed by  $^1\text{H}$  NMR. After evaporation under reduced pressure, 20 ml of dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added to the crude product. The solution was then added drop by drop, under a nitrogen atmosphere, to a solution of TREN (1.16 ml, 7.8 mmol) in 30 ml of dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  or to a solution of ethylenediamine (521  $\mu\text{l}$ , 7.8 mmol) in 30 ml of dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The solution was stirred overnight at 20°C. After washing with water (2  $\times$  50 ml) and with brine (50 ml), the organic phase was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and evaporated to give the desired compound as yellow oil. (yield: **3** = 91%; **4** = 94%).

*3-(2-(bis(2-aminoethyl)amino)ethyl)-1,1-di((Z)-octadec-9-enyl)urea (3)*.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.85 (t, 6H,  $\text{CH}_3$ ,  $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$  Hz); 1.24 (m, 44H,  $\text{CH}_2$ ); 1.48 (m, 4H,  $\text{CH}_2$   $\beta$ -N); 1.64 (4H, 2  $\text{NH}_2$ ); 1.98 (m, 8H,  $\text{CH}_2$   $\alpha$ -CH=CH); 2.50 (m, 4H ( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>N); 2.56 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 2.73 (m, 4H, 2  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ); 3.16 (t, 4H,  $\text{CH}_2$   $\alpha$ -N,  $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$  Hz); 3.27 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 5.15 (m, 1H, NH); 5.29 (m, 4H, CH=CH);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 14.0 (s, 2  $\text{CH}_3$ ), 22.6–32.5 (s, 28  $\text{CH}_2$  fatty chains), 38.6 (s, CONHCH<sub>2</sub>), 39.9 (2  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 47.3 (s, 2

$\text{CH}_2$   $\alpha$ -N), 54.0 (s,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 57.1 (s, 2  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 129.7 (s, 2 CH=CH), 129.9 (s, 2 CH=CH), 157.7 (CO); HRMS for  $\text{C}_{43}\text{H}_{87}\text{N}_5\text{ONa}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>, calcd 712.6803 found 712.6792.

*3-(2-aminoethyl)-1,1-di((Z)-octadec-9-enyl)urea (4)*.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.87 (t, 6H,  $\text{CH}_3$ ,  $^3J_{\text{H-H}} = 6.8$  Hz); 1.26 (m, 44H,  $\text{CH}_2$ ); 1.53 (m, 4H,  $\text{CH}_2$   $\beta$ -N); 1.54 (m, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 2.00 (m, 8H,  $\text{CH}_2$   $\alpha$ -CH=CH); 2.82 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  $^3J_{\text{H-H}} = 5.6$  Hz); 3.16 (t, 4H,  $\text{CH}_2$   $\alpha$ -N,  $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$  Hz); 3.28 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 4.81 (m, 1H, NH); 5.34 (m, 4H, CH=CH);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 14.1 (s, 2  $\text{CH}_3$ ), 22.6–32.0 (s, 28  $\text{CH}_2$  fatty chains), 41.9 (s,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 43.0 (s, CONHCH<sub>2</sub>), 47.4 (s, 2  $\text{CH}_2$   $\alpha$ -N), 129.8 (s, 2 CH=CH); 130.0 (s, 2 CH=CH); 157.9 (CO); HRMS for  $\text{C}_{39}\text{H}_{77}\text{N}_3\text{ONa}$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, calcd 604.6139 found 604.6131.

### General procedure for the synthesis of the imidazolo amphiphiles

Compounds **3** (300 mg, 0.43 mmol) and **4** (262 mg, 0.43 mmol) were dissolved in absolute ethanol, then imidazole carboxaldehyde (87 mg, 0.9 mmol or 45.5 mg, 0.47 mmol) and an excess of  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  was added under a nitrogen atmosphere. The reaction was heated at reflux for 4 h. The formation of the imine was confirmed by  $^1\text{H}$  NMR. After filtration and evaporation under reduce pressure, 20 ml of a solution of MeOH and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50/50) was added to the crude product. Then  $\text{NaBH}_4$  (97.6 mg, 2.58 mmol or 48.8 mg, 1.29 mmol) was added under a nitrogen atmosphere at 0°C. The reaction was stirred 1 h at 0°C and overnight at 20°C. After evaporation the residue was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml), washed, respectively, with a solution of 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in water, water and brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and evaporated. After purification by silica column chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  100/0–80/20), these compounds were obtained as orange oils. (yield: **5** = 95%; **6** = 85%).

*3-(2-(bis(2-((1H-imidazol-2-yl)methylamino)ethyl)amino)ethyl)-1,1-di((Z)-octadec-9-enyl)urea (5)*.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.86 (t, 6H,  $\text{CH}_3$ ,  $^3J_{\text{H-H}} = 6.4$  Hz); 1.24 (m, 44H,  $\text{CH}_2$ ); 1.45 (m, 4H,  $\text{CH}_2$   $\beta$ -N); 1.97 (m, 8H,  $\text{CH}_2$   $\alpha$ -CH=CH); 2.50 (m, 6H ( $\text{CH}_2$ )<sub>3</sub>N); 2.61 (m, 4H, 2  $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 3.09 (t, 4H,  $\text{CH}_2$   $\alpha$ -N,  $^3J_{\text{H-H}} = 7.6$  Hz); 3.27 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ); 3.90 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ -Imidazole); 5.23 (m, 1H, NH); 5.33 (m, 4H, CH=CH); 6.92 (s, 4H, CH from Imidazole);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 14 (s, 2  $\text{CH}_3$ ), 22.5–32.5 (s, 28  $\text{CH}_2$  fatty chains), 39.6 (s, CONHCH<sub>2</sub>), 45.7 (s, 2  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 46.0 (s, 2  $\text{CH}_2$ -Im), 47.4 (s, 2  $\text{CH}_2$   $\alpha$ -N), 53.2 (s, 2  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 53.4 (s,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 121.8 (s, 4 CH from Imidazole), 129.7 (s, 2 CH=CH), 129.9 (s, 2 CH=CH), 147.0 (s, 2 C from Imidazole), 158.3 (CO); HRMS for  $\text{C}_{51}\text{H}_{95}\text{N}_9\text{ONa}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>, calcd 872.7552 found 872.7552.

*3-(2-((1H-imidazol-2-yl)methylamino)ethyl)-1,1-di((Z)-octadec-9-enyl)urea (6)*.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.87 (t, 6H,



CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.2 Hz); 1.26 (m, 44H, CH<sub>2</sub>); 1.51 (m, 4H, CH<sub>2</sub> β-N); 2.01 (m, 8H, CH<sub>2</sub> α-CH=CH); 2.80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH); 3.16 (t, 4H, CH<sub>2</sub> α-N, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.2 Hz); 3.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH); 3.94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Imidazole); 5.01 (m, 1H, NH); 5.34 (m, 4H, CH=CH); 6.96 (s, 2H, CH from Imidazole); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 14.1 (s, 2 CH<sub>3</sub>), 22.6–32.0 (s, 28 CH<sub>2</sub> fatty chains), 39.8 (s, CONHCH<sub>2</sub>), 45.6 (s, CH<sub>2</sub>-Im), 47.5 (s, 2 CH<sub>2</sub> α-N), 49.0 (s, CH<sub>2</sub>NH), 122.0 (s, 2 CH from Imidazole), 129.7 (s, 2 CH=CH), 130.0 (s, 2 CH=CH), 146.1 (s, C from Imidazole), 158.3 (CO); HRMS for C<sub>43</sub>H<sub>81</sub>N<sub>5</sub>ONa [M+Na]<sup>+</sup>, calcd 706.6333 found 706.6339.

## Plasmids

pCMV-Luc (Genlantis, San Diego, CA, USA) is a plasmid encoding the luciferase reporter gene under the control of the human cytomegalovirus immediate-early gene promoter. pCMV-GFP (Clontech, Palo Alto, CA, USA) is a plasmid encoding green fluorescent protein reporter gene, under the control of the human cytomegalovirus immediate-early gene promoter. Plasmids were purified from recombinant *Escherichia coli* by means of Endofree plasmid purification columns (Qiagen, Hilden, Germany).

## Preparation of cationic lipids formulations for *in vitro* use

All lipids were stored as stock solutions in anhydrous organic solvents (CHCl<sub>3</sub>, MeOH or a mixture of both), at –20°C. Formulations were made with a cationic lipid DOSP with or without helper lipids (MM27, 5 and 6) at a standard molar ratio of 1:1 (mol/mol) to give a cationic liposome suspension with a fixed total positive charge concentration of 10 mM in water for *in vitro* assays, considering DOSP bears four positive charges per molecule. Appropriate volumes of each lipid stock were placed in a round-bottom flask (typically 5 ml). The solvent was slowly removed *in vacuo* to ensure production of an even lipid film. The film was rehydrated overnight at 4°C with water at a defined volume. The resulting solution was sonicated for 10–15 min at room temperature to form liposomes of appropriate size.

## Preparation of DNA lipoplexes

Formulation of DNA with DOSP liposomes were prepared as previously described [28]. Briefly, an equal volume of DNA (10 µg for physico-chemical characterization or 0.5 µg for *in vitro* cells transfection) was mixed with DOSP

liposomes associated or not with a helper lipid (MM27, 5 and 6), at a charge ratio (+/–) of 4.

## Cryo-TEM microscopy

Formulation complexes were prepared at 10 µg DNA/ml at a charge ratio (+/–) of 4, in NaCl at a final concentration of 150 mM. Five-microliter samples were deposited onto a holey carbon coated copper grid; the excess was blotted with a filter paper, and this grid was plunged into a liquid ethane bath cooled with nitrogen (Leica EM CPC; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Specimens were maintained at a temperature of approximately –170°C, using a cryo holder (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA), and were observed with a FEI Tecnai F20 electron microscope operating at 200 kV and at a nominal magnification (×50 000) under low-dose conditions. Images were recorded with a 2K × 2K Gatan slow scan CCD camera.

## Entrapment efficiency

Ethidium bromide (EtBr) fluorescence measurements were performed to determine the compaction of DNA by liposomes and were carried out on a Jobin-Yvon spex Fluoromax-4 spectrofluorimeter (Horiba Instruments, Irvine, CA, USA). Residual fluorescence displayed upon intercalation between noncomplexed DNA base pairs was monitored (excitation, 260 nm; emission, 560 nm) after adding EtBr (4 µg). DNA–lipid complexes (2 ml) were formed at a charge ratio of 4, ensuring complete complexation, and a kinetic analysis was used to monitor the increase of EtBr fluorescence after rapidly adding 10 µl of a solution containing sodium hexametaphosphate, at a concentration of 4 mg/ml. These small and highly diffusible polyphosphates can competitively form complexes with cationic lipids as a result of the negative charges borne by the phosphates. A magnetic stirrer at the bottom of the quartz cell ensured the homogenization of the solution.

The influence of the pH on DNA release was studied by forming the complexes in 10 mM HEPES buffer at pH 7 or 7.16 to mimic extracellular conditions and 10 mM MES buffer at pH 5.26, 6.36 or 6.5, modelling endosomal conditions.

## Cell and culture conditions

The transfection activity of the various vectors was evaluated in transient transfection experiments with four different cell lines. The cells lines tested were the HEK293 cell line, which is adenovirus-transformed human embryo kidney cells, and the C2C12, which is derived from mouse myoblast. All cells were grown in Dulbecco's modified

**Hybrid linker composition led to higher transfection efficiency**

Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% of L-glutamine and 1% of antibiotics (Pen/Strep) and routinely maintained at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air containing atmosphere.

For cardiomyocytes, briefly, newborn rat ventricles were dissected and dissociated in 9 ml of ADS buffer (NaCl 6.8 g/l, HEPES 4.76 g/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 120 mg/l, KCl 400 mg/l, glucose 1 g/l, MgSO<sub>4</sub> 100 mg/l, pH 7.4) containing 430 mg/ml of collagenase and 500 mg/ml of pancreatin at 37°C with gentle shaking. After 20 min of incubation, 1 ml of FCS was added and supernatant was centrifuged to collect cells. Then, total heart cells were separated by centrifugation on a 46–65% Percoll gradient. Cardiomyocytes were collected, seeded onto gelatine-coated plates and cultured during 24 h before transfection in a medium containing DMEM, 17% of medium 199, 10% of heat inactivated horse serum, 5% FCS and 1% of antibiotics (Pen/Strep).

24-well culture plates of fresh hepatocytes were obtained from Biopredic (Saint Gregoire, France).

Twenty-four hours prior to transfection, HEK, C2C12 and rat neonatal cardiomyocyte cells were seeded in 24-well culture plates at a density of 100 000 cells per well for HEK, 40 000 cells per well for C2C12 and 100 000 cells per well for rat neonatal cardiomyocytes, in 1 ml of complete medium and incubated at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air containing atmosphere.

**Transfection**

Twenty-four hours prior to transfection, cells were seeded as described above. Lipoplexes were prepared by mixing two equal solutions containing 0.5 µg of plasmid DNA and the lipidic vector at a charge ratio (+/–) of 4. Lipofectamine® (Thermo Fisher Scientific) was used in accordance with the manufacturer's instructions. Before transfection, medium was removed and replaced by 400 µl of fresh complete medium and 100 µl of lipoplex.

**Luciferase assay**

After 24 h of incubation at 37°C, 5% humidified CO<sub>2</sub>, cells were washed and lysed in Reporter Lysis Buffer 1X (Promega, Madison, WI, USA) supplemented with complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Sciences, Penzberg, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. Cell lysates were centrifuged at 9000 g for 5 min at 4°C. Luciferase activity was measured on an aliquot of supernatant using the Luciferase Assay System kit (Promega) in accordance with the manufacturer's instructions. Luminescence was recorded on a Victor X-3 multilabel plate reader (Perkin Elmer,

Waltham, MA, USA). All measurements were performed in triplicate.

**Cell viability**

Twenty-four hours prior to transfection, cells were seeded as described above. Before transfection, medium was removed and replaced by 400 µl of fresh complete medium. Each well received 0.5 µg of pCMV-Luc plasmid complexed to lipidic vectors in OptiMEM® at the same charge ratios used for transfection. As a control, Lipofectamine® was used in accordance with the manufacturer's instructions. Cells on the standard plate received only vehicle (OptiMEM®). After 24 h of incubation at 37°C, 5% humidified CO<sub>2</sub>, cytotoxicity was measured using the Cell Titer 96 Non Radioactive Cell Proliferation Assay in accordance with the manufacturer's instructions (Promega). After solubilization of the formazan crystals, optical density was read at 560 nm using a Victor X-3 multilabel plate reader. Cell survival in the treated samples was calculated using a regression curve established from the untreated standard serial dilutions of the cell suspension. All measurements were performed in triplicate.

**Flow cytometry experiments**

Twenty-four hours after transfection, samples of cells (10<sup>5</sup> to 10<sup>6</sup>) were collected and re-suspended in phosphate-buffer saline (PBS). The resulting cell suspension was assayed for the expression of GFP by flow cytometer analysis using a FACScalibur flow cytometer (Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). The percentage of GFP-positive cells was determined using the flow cytometer program. All measurements were performed in triplicate.

**Fluorescence microscopy**

GFP expression in cardiomyocytes was visualized 24 h following lipid transfection. Cells were washed with PBS and fixed with 3.7% paraformaldehyde solution for 10 min at room temperature. Glass coverslips were mounted with ProLong antifade DAPI reagent (Thermo Fisher Scientific) and visualized with an Axiovert epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Images were treated using ImageJ, version 1.42q (NIMH, Bethesda, MD, USA).

**Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Values are expressed

as the mean  $\pm$  SEM. Significant differences between groups are indicated ( $*p < 0.05$  and  $**p < 0.01$ ) by the Mann–Whitney *U*-test.

## Results and Discussion

### Synthesis of the imidazolo lipidic derivatives

To highlight the importance of the linker between the two acyl chains present in the structure of imidazole-based helper lipids, we compared the transfection efficiency of two types of liposomes. The first liposome tested forms a hybrid lipidic membrane resulting from the association of the cationic lipid DOSP, with the imidazole-based helper lipid MM27, containing, respectively, an amido and phosphoramido linker between the two oleyl chains and the polar head (Figure 1). The other two formulations constitute homogeneous binary liposomes resulting from the association of DOSP with imidazole-based helper lipids also bearing a dioleoylamido hydrophobic backbone.

To synthesize imidazole-based helper lipids with a dioleoylamido backbone, we attempted the coupling of carbamoylchloride of DOLA (1) to histamine in one step, as carried out for MM27. Unfortunately, the solubility of histamine was very low in organic solvents, except in methanol. Because the high reactivity of (1) with the methanol led to the formation of the methyl carbamate derivative, the introduction of the imidazole ring on the helper lipid was achieved by another chemical method.

The synthetic routes for the derivatives 5 and 6 reported in the present study are illustrated in Figure 2. We first generated the carbamoyl chloride of DOLA (1) *in situ*, by reaction of 1 [21] with triphosgene [29,30]. This compound was not isolated, although its formation was confirmed by  $^1\text{H}$  NMR. Indeed, the signal of the methylene protons in  $\alpha$  of the nitrogen in DOLA at 2.60 p.p.m. disappeared after 2 h and new signals at

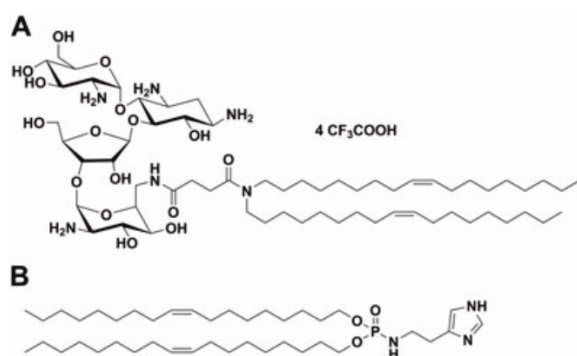


Figure 1. Structure of DOSP (A) and MM27 (B)

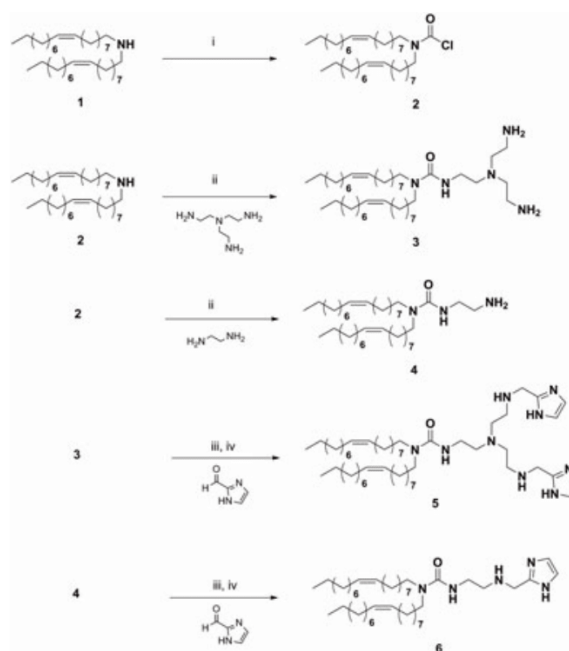


Figure 2. Synthesis of the imidazolo amphiphile ureas. (i) Triphosgene,  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$  for 30 min,  $20^\circ\text{C}$  for 90 min (ii) Excess TREN or ethylenediamine,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , room temperature, overnight (3: 91%, 4: 94%) (iii) Imidazole carboxaldehyde,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , EtOH, 4 h, reflux (iv)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (50/50), room temperature, overnight (5: 95%, 6: 85%).

3.30 p.p.m. were observed. This deshielding confirmed the formation of the N-COCl group. Then, the coupling between the amines (TREN and ethylenediamine) and this intermediate 2 afforded the amphiphiles ureas 3 and 4 in yields of 91% and 94%, respectively. To avoid the formation of the di- or tri-substituted compounds, a large excess of amines was used as reported previously [26]. The reductive amination ensuing [31] afforded compounds 5 and 6 in two steps, in a yield of 95%. The formation of the imines, in the first step of the reductive amination, was confirmed by  $^1\text{H}$  NMR via apparition of a characteristic signal at 8.2 p.p.m.

These two steps sequence allowed us to obtain these new compounds 5 and 6 with an overall yield of approximately 80%.

### Morphology and structure of complexes formed with DNA

Next, we studied the morphology of liposomes made of DOSP with helper lipid MM27 or 6 and their organization when complexed with plasmid DNA. We investigated whether supramolecular particles resulting from the



**Hybrid linker composition led to higher transfection efficiency**

9

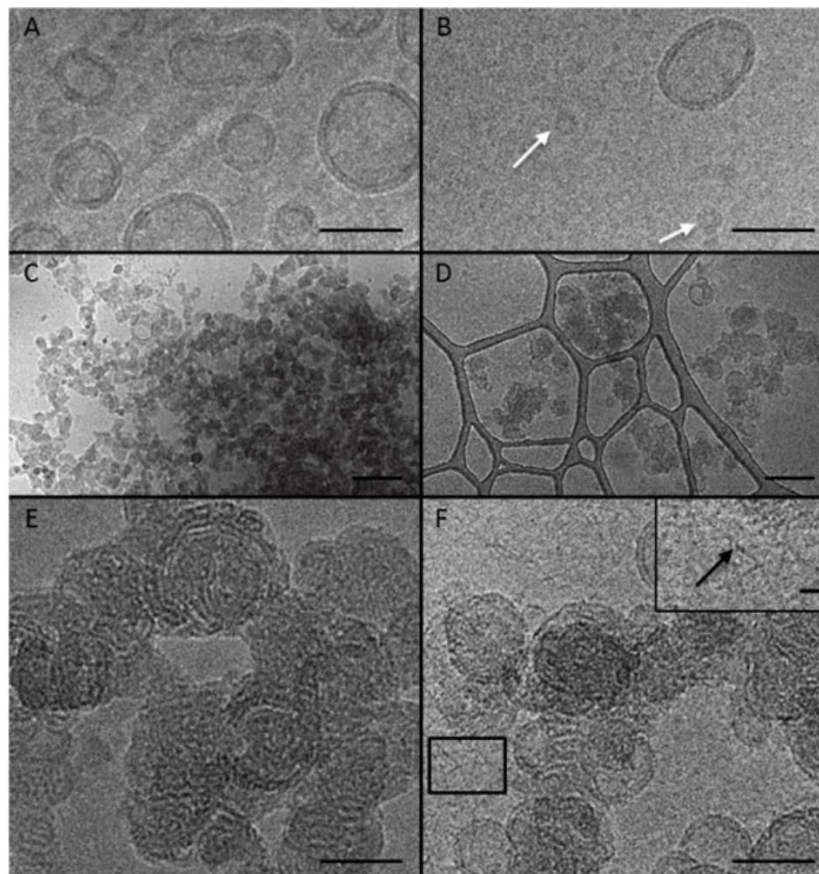
association of DNA with cationic liposomes that include helper lipids possessing either an amido or phosphoramido linker, could have different morphologies inducing different properties.

We observed, by cryo-TEM (Figure 3), that both lipid mixtures formed unilamellar liposomes (Figures 3A and 3B), with DOSP/MM27 being much larger than DOSP/6, which produced very small liposomes; this observation was also confirmed by dynamic light scattering-based methods (data not shown). In the presence of plasmid DNA (similar lipid to DNA ratio), large assemblies were formed with DOSP/MM27 (Figure 3C). These structures revealed stacks of lipid layers separated by DNA strands, showing that DNA molecules were tightly bound to lipid membrane as previously described for lipoplexes [7] (Figure 3E). By contrast, assemblies formed with DOSP/6 were smaller (Figure 3D). Moreover, the plasmid DNA did not appear to be densely packed. Stacks of layers of lipid and DNA were scarcely visible and intact liposomes

were present, suggesting that DNA molecules were loosely bound to liposome. Note that DNA strands were visible at the vicinity of the assemblies (Figure 3F, inset). This strongly indicates that the linker between the two acyl chains present in the structure of imidazole-based helper lipid plays a critical role in the morphology and structure of DNA complexes. Unexpectedly, hybrid lipidic membrane led to a tighter DNA complexation than that observed with homogeneous lipidic membrane.

**Decomplexation of hybrid and homogeneous complexes**

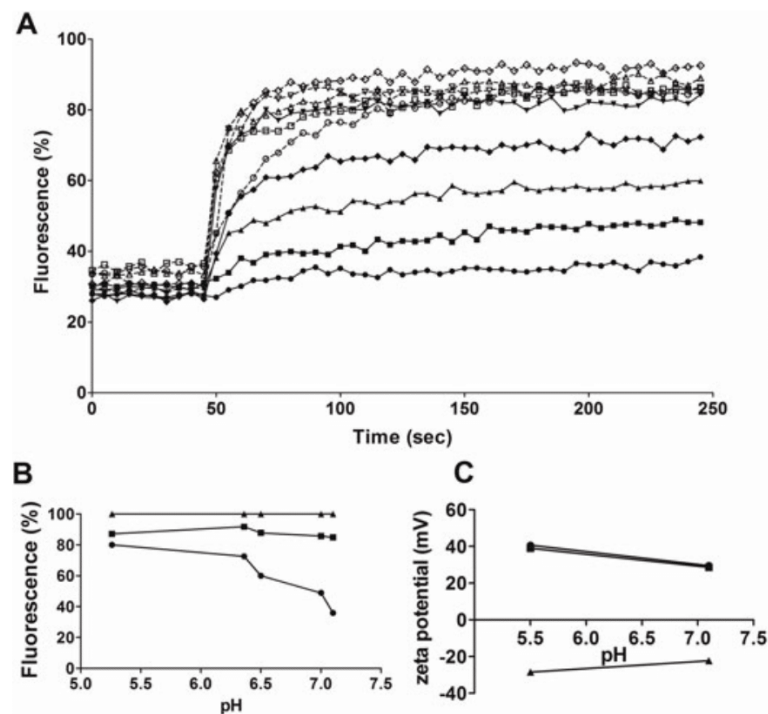
Next, we investigated whether the supramolecular assemblies illustrated in Figure 3, resulting from the association of DNA with cationic liposomes that include helper lipids possessing either an amido or phosphoramido linker, could have different decomplexation behaviour. Accordingly, we



**Figure 3.** CryoTEM images of liposomes made of DOSP with colipid MM27 or 6 and complexed with DNA. (A) DOSP/MM27 liposome (C, E) DOSP/MM27 with DNA (B) DOSP/6 liposome. Note the presence of very small liposomes (white arrows) (D, F) DOSP/6 with DNA. Inset: note DNA strands are visible (black arrow). Scale bars = 0.5 μm (A, B, E, F), 50 nm (C, D) and 10 nm (inset).

submitted DOSP/MM27-DNA and DOSP/6-DNA complexes to small anionic polyphosphates of six phosphate units and measured the decomplexation of DNA by the increase of EtBr fluorescence as a result of the intercalation of the fluorescent probe between the base pairs of decomplexed DNA molecules. Figure 4A shows that, at acidic pH 5.26, the kinetics of the fluorescence increase upon the addition of polyphosphates was similar between the two types of assemblies and reached 80% after a few seconds. These results indicate that, in an acid environment mimicking the endosomal pH, DNA decomplexation was very fast and was not influenced by whether the imidazole ring is linked via a dioleoylphosphoramido or dioleoylamido lipidic backbone. Measuring the kinetics of decomplexation at different pH, ranging from 5.26–7.1, showed that the fluorescent signal for DOSP/6-DNA complexes was 80% for every pH condition of the medium (Figure 4B), indicating that DNA complexes were not stable. By contrast, with DOSP/MM27-DNA complexes,

the fluorescent signal depended on the pH of the medium and, for pH 7.1, which is the same as in extracellular conditions, the fluorescent signal was almost the same in the presence or in the absence of polyphosphates, indicating that DNA complexes were stable. Therefore, the addition of polyphosphates on the two different types of assemblies led either to the same DNA decomplexation irrespective of the pH for DOSP/6 complexes or to a much lower decomplexation with DOSP/MM27 when the pH increase and reached neutrality. To rule out any effect of the electrostatic forces between the positively-charged complexes and the polyphosphate that might be different between the two liposomes, we measured the zeta potential of the two types of complexes at the different pH values. As shown in Figure 4C, the zeta potential was the same for DOSP/MM27 and DOSP/6-DNA complexes, irrespective of pH. Altogether, this strongly suggests that DOSP/MM27-DNA complexes were more resistant than DOSP/6-DNA complexes at pH 7.2 mimicking the



**Figure 4.** Influence of the lipidic structure of the helper lipid on the decomplexation of DOSP/MM27 and DOSP/6-DNA lipoplexes. The compaction of DNA by cationic liposomes was monitored by EtBr fluorescence (A, B). The residual fluorescence was assayed using a Jobin-Yvon spex Fluoromax-4 spectrofluorimeter. (A) Complexes DOSP/MM 27 (full pattern) or DOSP/6 (empty pattern) were obtained by mixing cationic liposomes with 10  $\mu\text{g}$  of plasmid DNA, at a charge ratio (+/-) of 4 in 150 mM NaCl and 10 mM MES or HEPES to generate the different pH: pH 5.26 (inversed triangle), pH 6.36 (diamond), pH 6.5 (triangle), pH 7 (square) and pH 7.1 (circle). Fifty seconds after fluorescence measurement corresponding to DOSP/MM27 and DOSP/6-DNA lipoplexes, 10  $\mu\text{l}$  of a polyphosphate solution at 4 mg/ml was added to the complexes. The fluorescence signal was then measured for 250 s. (B) representation of the fluorescence signal obtained with DOSP/MM27 (circles) and DOSP/6-DNA (squares) complexes, 250 s after addition of the polyphosphate solution. A control was conducted in the same experimental conditions with naked DNA (triangles). (C) Zeta potential measurement of DOSP/MM 27 (circle) or DOSP/6-DNA (square) complexes prepared at charge ratio of 4 (+/-) in 150 mM NaCl and 10 mM of MES or HEPES to give pH of 5.5 and 7.2. Naked DNA was used as a control in the same experimental conditions (triangle).

Hybrid linker composition led to higher transfection efficiency

11

extracellular pH because they were not affected by the decomplexing agent. These results suggest that the lipid membrane with hybrid dioleyl linker that led to DNA strands being tightly bound to liposomes results in lipoplexes with more resistance to DNA complexation at extracellular physiological pH.

Cell viability

The cytotoxicity of the DOSP used alone or formulated with the helper lipids MM27, 5 or 6, was tested on the HEK cell line. Figure 5 shows that the cell viability varied between 80% and 100% when using DOSP, DOSP/MM27, DOSP/5 and DOSP/6 compared to the 70% obtained with Lipofectamine®. It is interesting to note that no cytotoxicity was observed with DOSP/MM27 on the HEK cell line, which is in agreement with results in the C2C12 cell line reported by Billiet *et al.* [27].

Altogether, we established that the dioleylphosphoramido backbone helper lipid MM27 formulated with DOSP induced lower cytotoxicity compared to dioleylamido lipid formulations 5 and 6.

In vitro transfection efficiency on adherent cell lines

Next, the formulations of DOSP or DOSP/imidazole-based helper lipids (MM27, 5 and 6) were tested for their efficiency in transfecting a plasmid DNA encoding for the luciferase or the GFP, in two different cell lines: a kidney cell line HEK and a muscular cell line C2C12.

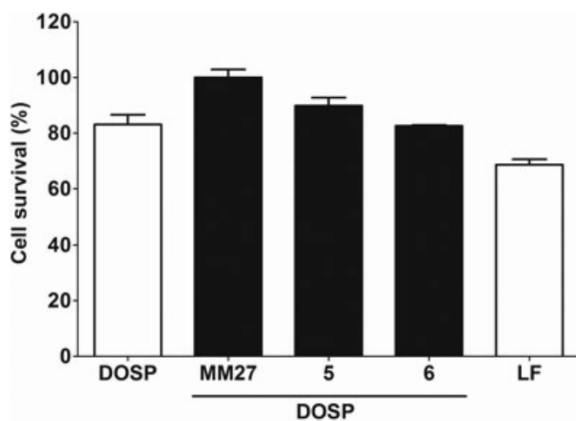


Figure 5. Percentage of cell survival on HEK cell line. Cells were transfected with 0.5 µg of pCMV-Luc plasmid complexed with DOSP (white bars), DOSP/MM27, DOSP/5 and DOSP/6 (black bars) or Lipofectamine® (LF) (white bars). Lipofectamine® was used in accordance with the manufacturer's instructions. Cytotoxicity was evaluated using the Cell Titer 96 Non Radioactive Cell Proliferation Assay.

Figure 6 shows the luciferase expression level obtained after plasmid transfection of HEK (Figure 6A) or C2C12 (Figure 6B) using the DOSP alone or formulated with the helper lipid MM27, 5 or 6. Transfection efficiencies were compared with the commercial transfection agent Lipofectamine®. The results showed that the DOSP/MM27 led to a higher level of luciferase expression compared to the DOSP alone or Lipofectamine®. The presence of the helper lipids 5 or 6 did not increase the transfection efficiency compared to MM27, suggesting that mixture of cationic lipid and helper lipid with similar dioleylamido hydrophobic backbone is not favorable for transfection. These results highlight the importance of the linker within the backbone structure of the colipid, which directly impacted upon transfection activity.

Next, we assessed the percentage of transfected cells using the formulations DOSP, DOSP/MM27, DOSP/5 and DOSP/6

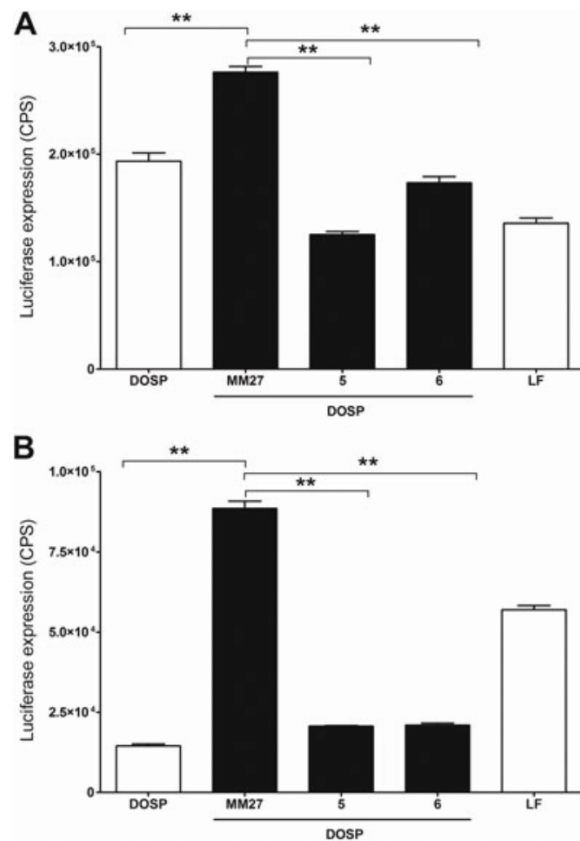


Figure 6. Effect of helper lipids on luciferase transfection activity. Plasmid DNA transfection was performed on HEK (A) and C2C12 cells (B). Cells were transfected with 0.5 µg of plasmid DNA, encoding luciferase, complexed with DOSP (white bars), DOSP/helper lipids (black bars) or Lipofectamine® (white bars). Lipofectamine® mediated transfections were performed in accordance with the manufacturer's instructions. Plates were incubated 24 h before cell lysis and luciferase activity measurement.



combined with a plasmid encoding the GFP. The percentage of cells expressing the GFP transgene was assessed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) on both cell lines. Figure 7 shows that the percentage of transfected HEK cells (Figure 7A) and C2C12 cells (Figure 7B) was optimal in the presence of the dioleylphosphoramido hydrophobic backbone helper lipid MM27. This result suggests that the use of hybrid liposomes with respect to the dioleyl linker enhances the number of transfected cells, probably as a result of their increased stability.

Taken together, we confirmed that adding a helper lipid to the lipoplex formulation can enhance the efficiency of gene delivery. Furthermore, we demonstrated that the structure of the dioleyl linker is an essential parameter for transfection efficacy. The use of the dioleylphosphoramido hydrophobic backbone of the helper lipid MM27 associated

with the cationic lipid DOSP, leading to liposomes with hybrid dioleyl linker, is demonstrated as the optimal combination to use for the efficient *in vitro* DNA transfection of adherent cell lines. Moreover, the use of two different plasmids, namely luciferase and GFP, attests that the formulation behaviours were not influenced by the DNA sequence or the nature of the transgene. These results also suggest the importance of having a phospholipid, acting as biomimetic agent, in cationic liposomes formulations. Indeed, the biomimetic vector obtained with hybrid liposomes offered the possibility of enhancing transfection efficiency by facilitating the transfer of lipoplexes through phospholipid-rich cellular membranes.

### ***In vitro* transfection efficiency on primary cells**

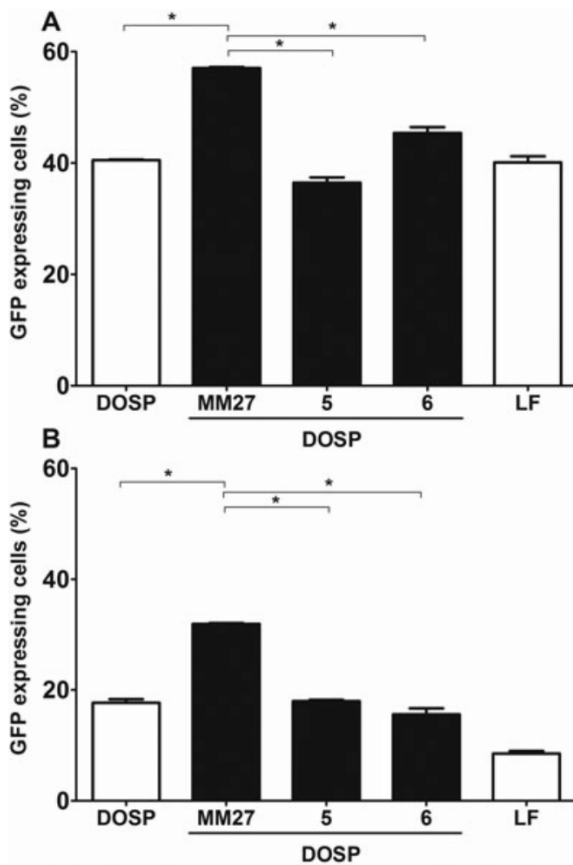
Several reagents have been identified for efficiently transfecting cell lines, although effective gene transfer in primary mammalian cells, including cardiomyocytes and hepatocytes, is still limited. Primary cells are often preferred over transformed or immortalized cell lines because they are biologically more relevant and mimic the *in vivo* situation much closely. Thus, new products need to be developed to overcome these limitations. Based on the transfection activity obtained on HEK and C2C12, the DOSP/MM27 formulation was selected to assess DNA transfection of rat neonatal cardiomyocytes and mice hepatocytes. The results illustrated in Figures 8 and 9 show the optimal luciferase values and the percentages of transfected cells obtained with DOSP, DOSP/MM27 and Lipofectamine® in cardiomyocytes and hepatocytes, respectively.

Figures 8A and 9A show that the imidazole-based helper lipid MM27, leading to liposomes with hybrid lipidic membranes, was required for efficient luciferase reporter gene expression. Indeed, DOSP formulated with MM27 increased luciferase expression compared to DOSP alone or Lipofectamine®.

To characterize more precisely the transfection efficiency of the DOSP/MM27 compounds, we investigated the transfection of a plasmid DNA encoding the GFP protein, aiming to determine the number of cardiomyocytes successfully transfected. Figure 8 shows that the number of positive cells expressing the GFP protein was increased with the DOSP/MM27 formulation (Figures 8D and 8E) compared to Lipofectamine® (Figures 8B and 8C).

We also evaluated the transfection efficiency of DOSP, DOSP/MM27 and Lipofectamine® by FACS analysis on hepatocytes. Figure 9B shows that the number of positive cells expressing the GFP protein was increased with the DOSP/MM27 formulation compared to DOSP alone or Lipofectamine®.

*In vitro* experiments on cell lines or primary cells demonstrated clearly that the use of liposomes with hybrid dioleyl



**Figure 7.** Effect of helper lipids on GFP transfection activity. Plasmid DNA transfection was performed on HEK (A) and C2C12 cells (B). Cells were transfected with 0.5 µg of plasmid DNA, encoding GFP, complexed with DOSP (white bars), DOSP/helper lipids (black bars) or Lipofectamine® (white bars). Lipofectamine® mediated transfections were performed in accordance with the manufacturer's instructions. Plates were incubated 24 h before flow cytometry experiment.

Hybrid linker composition led to higher transfection efficiency

13

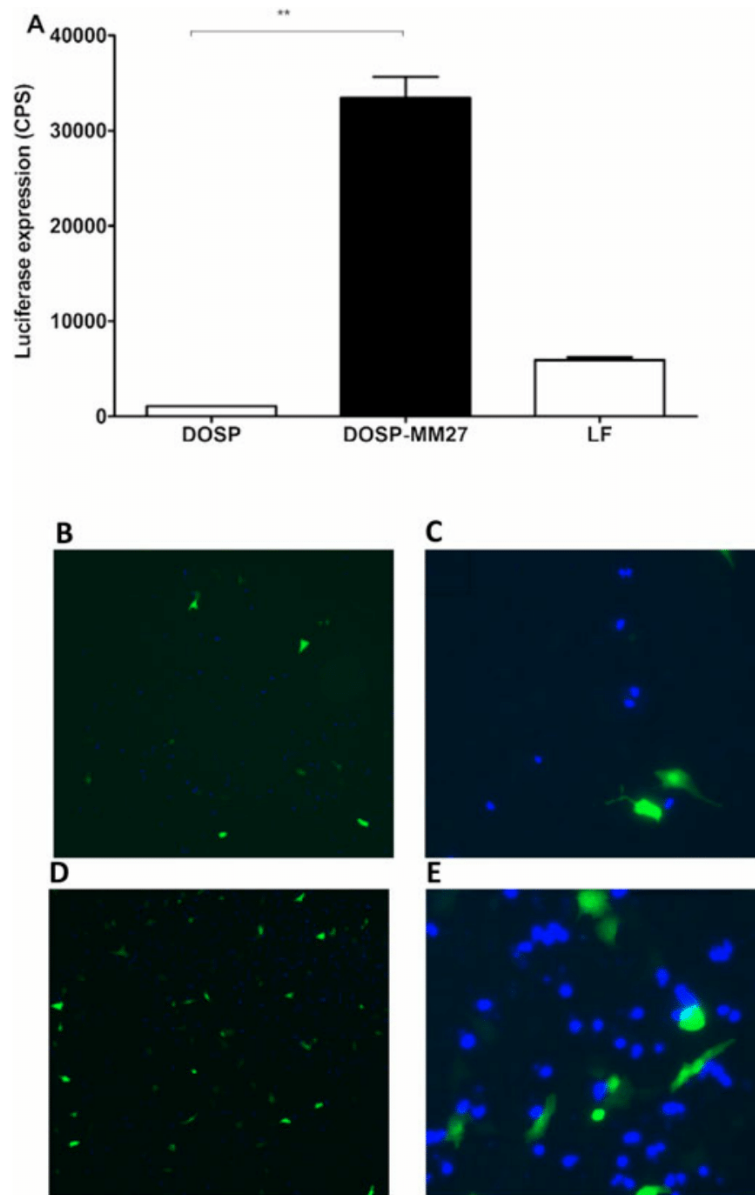
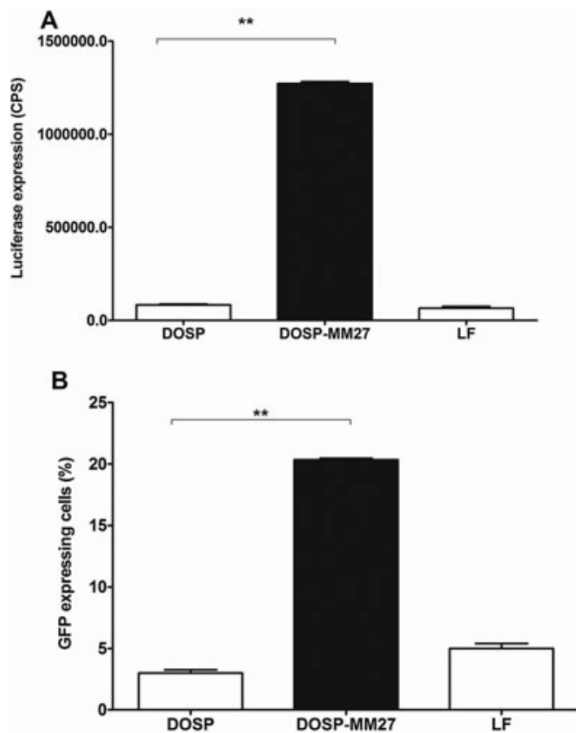


Figure 8. Transfection activity in newborn rat cardiomyocytes. (A) Cells were transfected with 0.5 µg of pCMV-Luc plasmid complexed with DOSP (white bars), DOSP/MM27 (black bars) or Lipofectamine® (white bars). Cells were also transfected with 0.5 µg of plasmid DNA, encoding eGFP, complexed with DOSP/MM27 (D, E) or Lipofectamine® (B, C). Lipofectamine® mediated transfections were performed in accordance with the manufacturer’s instructions. Plates were incubated 24 h before cells lysis and luciferase activity measurement or fluorescence microscopy analysis.

linker formed from amido-based cationic lipid and phosphoramido helper lipid (association of DOSP with MM27) is a key factor for *in vitro* transfection efficiency. Knowing that the morphology and structure of complexes were strongly affected by the presence of hybrid or homogeneous linkers between the two oleyl chains, and also that

complexes made with hybrid linker were not decomplexed at neutral pH in the presence of decomplexing agent, the mechanism by which transfection efficiency was increased would be more related to a better resistance and internalization of complexes in more cells, rather than a facilitated intracellular trafficking of DNA.





**Figure 9.** Transfection activity in primary mice hepatocytes. (A) Cells were transfected with 0.5  $\mu$ g of pCMV-Luc plasmid complexed with DOSP (white bars), DOSP/MM27 (black bars) or Lipofectamine® (white bars). (B) Cells were also transfected with 0.5  $\mu$ g of plasmid DNA, encoding eGFP, complexed with DOSP (white bars), DOSP/MM27 (black bars) or Lipofectamine® (white bars). Lipofectamine® mediated transfections were performed in accordance with the manufacturer's instructions. Plates were incubated 24 h before cells lysis and luciferase activity measurement or FACS analysis.

## Conclusions

Taken together, the findings of the present study demonstrate the importance of the linker between the two acyl

## References

1. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 7413–7417.
2. Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 1987; **262**: 4429–4432.
3. Hefesha H, Loew S, Liu X, *et al.* Transfer mechanism of temoporfin between liposomal membranes. *J Control Release* 2011; **150**: 279–286.
4. Hattori Y, Suzuki S, Kawakami S, *et al.* The role of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) in targeted gene delivery with mannosylated cationic liposomes via intravenous route. *J Control Release* 2005; **108**: 484–495.
5. Mukherjee K, Bhattacharyya J, Sen J, *et al.* Covalent grafting of common trihydroxymethylaminomethane in the headgroup region imparts high serum compatibility and mouse lung transfection property to cationic amphiphile. *J Med Chem* 2008; **51**: 1967–71.
6. Pitard B, Aguerre O, Airiau M, *et al.* Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14412–14417.
7. Pitard B, Oudrhiri N, Vigneron JP, *et al.* Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 2621–2626.
8. Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H. Uptake pathways and subsequent

chains within the hydrophobic backbone structure on the helper lipid for promoting efficient gene transfer *in vitro*. Liposomes with hybrid dioleyl linker consisting of the dioleylphosphoramido backbone helper lipid MM27 formulated with DOSP led to high transgene expression, and a high percentage of transfected cells with very low cytotoxicity *in vitro*, compared to formulations of DOSP with the homogeneous dioleylamido hydrophobic backbone helper lipids 5 and 6. The mechanism of action of those hybrid lipid membrane DNA complexes is probably related to the structure of complexes where DNA is densely packed and resistant to decomplexation in extracellular conditions and labile in endosomal conditions. Therefore, defects at the lipid membrane level, probably induced by the different dioleyl linkers in the cationic and imidazole-based lipids, led to a more favourable situation with respect to the DNA complexation rather than homogeneous lipid membranes.

Further work is in progress aiming to clarify whether the best association for generating hybrid membranes is the cationic polar headgroup linked to the dioleylamido backbone and the imidazole ring on the dioleylphosphoramido backbone or the inverse situation.

## Acknowledgements

We thank Delphine Béziau, Virgine Forest, Stéphanie Lemarchand-Mindé and Martine Le Cunff for technical assistance. This work was supported by special grants received from the 'Association Française contre les Myopathies' (Evry, France) and from BPIFrance financement (Paris, France) for Emerit and Hepavac. This work was realized in the context of the IHU-Cesti project, which received French government financial support managed by the National Research Agency via the 'Investment Into The Future' program ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Métropole and the Pays de la Loire Region. Laurence Dallet and Thibault Colombani are supported by funds received from IHU-Cesti (Investissement d'Avenir ANR-10-IBHU-005, région Pays de la Loire et Nantes Métropole). The authors report that no competing financial interests or conflicts of interest exist.

## Hybrid linker composition led to higher transfection efficiency

15

- intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev* 2006; **58**: 32–45.
9. Gao X, Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther* 1995; **2**: 710–722.
  10. Safinya CR. Structures of lipid-DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. *Curr Opin Struct Biol* 2001; **11**: 440–448.
  11. Li S, Rizzo MA, Bhattacharya S, Huang L. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther* 1998; **5**: 930–937.
  12. Mével M, Neveu C, Gonçalves C, et al. Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays. *Chem Commun* 2008; **27**: 3124–3126.
  13. Maury B, Gonçalves C, Tresset G, et al. Influence of pDNA availability on transfection efficiency of polyplexes in non-proliferative cells. *Biomaterials* 2014; **35**: 5977–5985.
  14. Leng Q, Chou S-T, Scaria PV, et al. Increased tumor distribution and expression of histidine-rich plasmid polyplexes. *J Gene Med* 2014; **16**: 317–328.
  15. Kos P, Lächelt U, Herrmann A, et al. Histidine-rich stabilized polyplexes for cMet-directed tumor-targeted gene transfer. *Nanoscale* 2015; **7**: 5350–5362.
  16. Budker V, Gurevich V, Hagstrom JE, et al. pH-sensitive, cationic liposomes: a new synthetic virus-like vector. *Nat Biotechnol* 1996; **14**: 760–764.
  17. Kostarelos K, Miller AD. Synthetic, self-assembly ABCD nanoparticles; a structural paradigm for viable synthetic non-viral vectors. *Chem Soc Rev* 2005; **34**: 970–994.
  18. Midoux P, Pichon C, Yaouanc J-J, Jaffrès P-A. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br J Pharmacol* 2009; **157**: 166–178.
  19. Belmont P, Aissaoui A, Hauchecorne M, et al. Aminoglycoside-derived cationic lipids as efficient vectors for gene transfection in vitro and in vivo. *J Gene Med* 2002; **4**: 517–526.
  20. Sainlos M, Belmont P, Vigneron J-P, et al. Aminoglycoside-derived cationic lipids for gene transfection: synthesis of kanamycin A derivatives. *Eur J Org Chem* 2003; **15**: 2764–2774.
  21. Sainlos M, Hauchecorne M, Oudrhiri N, et al. Kanamycin A-derived cationic lipids as vectors for gene transfection. *ChemBiochem* 2005; **6**: 1023–1033.
  22. Mével M, Sainlos M, Chatin B, et al. Paromomycin and neomycin B derived cationic lipids: synthesis and transfection studies. *J Control Release* 2012; **158**: 461–469.
  23. Arya DP, Coffee RL, Willis B, Abramovitch AI. Aminoglycoside-nucleic acid interactions: remarkable stabilization of DNA and RNA triple helices by neomycin. *J Am Chem Soc* 2001; **123**: 5385–5395.
  24. Rege K, Hu S, Moore JA, et al. Chemoenzymatic synthesis and high-throughput screening of an aminoglycoside-polyamine library: identification of high-affinity displacers and DNA-binding ligands. *J Am Chem Soc* 2004; **126**: 12306–12315.
  25. Rege K, Ladiwala A, Hu S, et al. Investigation of DNA-binding properties of an aminoglycoside-polyamine library using quantitative structure-activity relationship (QSAR) models. *J Chem Inf Model* 2005; **45**: 1854–1863.
  26. Mével M, Breuzard G, Yaouanc J-J, et al. Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate lipids: high efficiency of an imidazolium derivative. *ChemBiochem* 2008; **9**: 1462–1471.
  27. Billiet L, Gomez J-P, Berchel M, et al. Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line. *Biomaterials* 2012; **33**: 2980–2990.
  28. Chèvre R, Le Bihan O, Beilvert F, et al. Amphiphilic block copolymers enhance the cellular uptake of DNA molecules through a facilitated plasma membrane transport. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: 1610–1622.
  29. Igarashi Y, Yanagisawa E, Ohshima T, et al. Synthesis and evaluation of carbamate prodrugs of a phenolic compound. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2007; **55**: 328–333.
  30. Jitsuoka M, Tsukahara D, Ito S, et al. Synthesis and evaluation of a spiroisobenzofuranone class of histamine H3 receptor inverse agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; **18**: 5101–5106.
  31. Kaur N, Delcros J-G, Archer J, et al. Designing the polyamine pharmacophore: influence of N-substituents on the transport behavior of polyamine conjugates. *J Med Chem* 2008; **51**: 2551–2560.

Dans le troisième article, suite aux résultats de la précédente étude, nous avons voulu approfondir l'investigation de ces types d'assemblages supramoléculaires avec différentes molécules d'acides nucléiques (ADN, ARNm et siRNA). Nous avons émis l'hypothèse que les différentes étapes du mécanisme de transfection pourraient être affectées par les propriétés d'auto-assemblages des complexes formées entre les lipides cationiques et les acides nucléiques. L'objectif principal du travail était de comprendre comment les propriétés physico-chimiques des lipoplexes peuvent affecter la stabilité et l'efficacité de transfection des acides nucléiques.

Les mêmes compositions lipidiques que l'étude précédente ont été utilisées. Seulement un nouveau lipide cationique a été synthétisé afin d'avoir les différentes compositions de liposomes homogènes (**CLN** : **HLN** ou **CLP** : **HLP**) et de liposomes hybrides (**CLP** : **HLN** ou **CLN** : **HLP**). Les deux lipides cationiques ont une tête polaire de paromomycine et les deux colipides neutres possèdent une base d'imidazole. Le lipide cationique **DOSP** (**CLN**) possédant une liaison amide entre la tête polaire et la queue hydrophobe ou le nouveau lipide cationique avec une liaison phosphoramide (**CLP**) ont été combinés avec un colipide neutre (Figure 44):

- avec un bras espaceur ayant une liaison amide (**HLN**)
- avec un bras espaceur ayant une liaison phosphoramide (**HLP**)

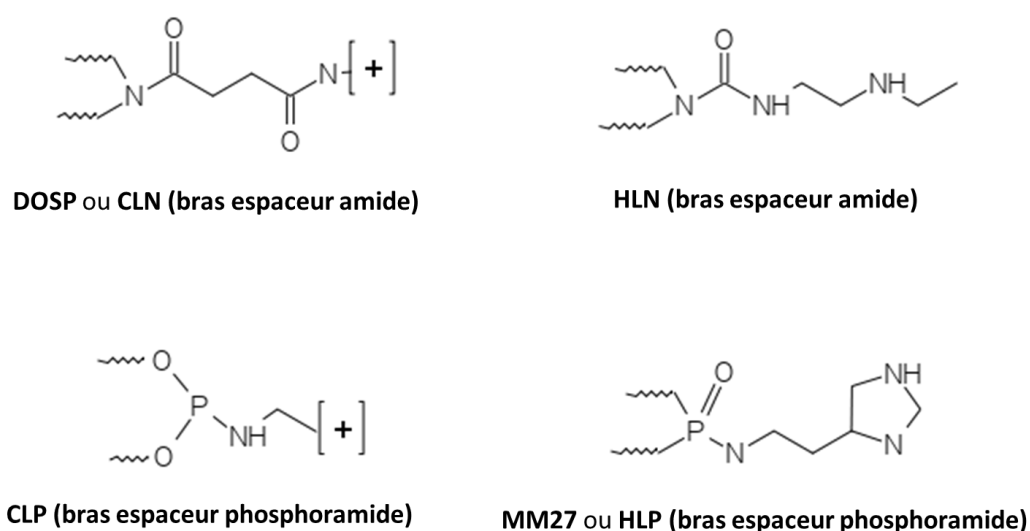
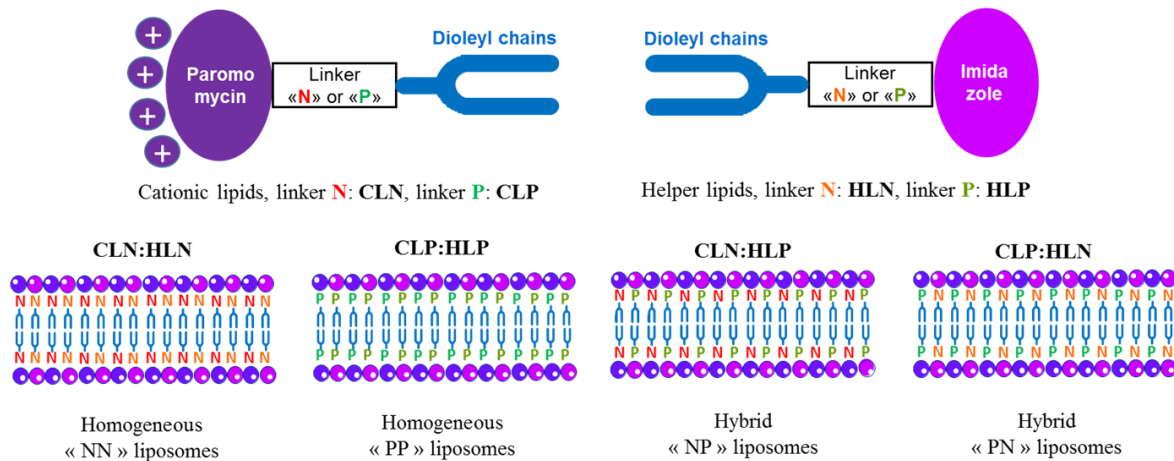


Figure 44 : Structures des lipides cationiques (**CLP** ou **CLN**) et des colipides (**HLP** ou **HLN**)

L'association de ces lipides cationiques avec ces colipides neutres conduit à des phases lamellaires homogènes (**CLN : HLN** ou **CLP : HLP**) ou hybrides (**CLP : HLN** ou **CLN : HLP**) (Figure 45).



**Figure 45 : Structures des liposomes homogènes et hybrides.**

Dans ces travaux, je me suis intéressée à caractériser les composés lipidiques homogènes et hybrides complexés avec l'ADN dans deux milieux différents de complexation en cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM). Ces résultats ont été appuyés et corrélés aux expériences d'efficacité de transfection et de décomplexation. Nous avons évalué l'efficacité de transfection des quatre formulations de liposomes avec des molécules d'acides nucléiques (ADN, ARNm et siRNA) sur des lignées cellulaires (cellules HeLa, C2C12) mais aussi sur des cultures de cellules primaires (fibroblastes humains et de souris embryonnaires et cellules musculaires d'aorte de rat).

Pour les liposomes hybrides (**CLN : HLP** ou **CLP : HLN**) :

Dans le milieu de complexation NaCl, les lipoplexes forment des assemblages hétérogènes. Ces structures apparaissent sous la forme d'empilements de plusieurs couches lipidiques séparées par des couches denses en électrons correspondant à des molécules d'ADN. Dans le milieu de complexation DMEM, les liposomes hybrides présentent différentes morphologies avec des molécules d'ADN fortement piégées dans les lipoplexes. La mesure de complexation a montré que la fluorescence était proche de 0 et stable indiquant que l'ADN était complètement complexé. En présence d'ADN ou d'ARNm, les liposomes hybrides ont montré un nombre élevé de cellules transfectées. En présence de siRNA, une forte

inhibition (>50%) a été observée. Aucune différence notable n'a pu être observée entre les deux formulations hybrides. Excepté en présence d'ARNm, la formulation liposomale **CLP : HLN** présente une très forte activité dans tous les types cellulaires.

Pour les liposomes homogènes (CLN : HLN ou CLP : HLP) :

Dans le milieu de complexation NaCl, les lipoplexes apparaissent comme de petits agrégats formés de petites grappes présentant des structures polymorphes. Aucune couches de lipides ne sont observées, seulement quelques fragments d'ADN libre. Dans le milieu de complexation DMEM, les liposomes homogènes présentent une organisation bien définie avec des couches concentriques multilamellaires. Sur la face externe, on peut noter des fragments d'ADN donc l'ADN n'a pas été intercalé entre les couches lipidiques. La mesure de complexation a montré une certaine fluorescence donc l'ADN n'est pas totalement complexé. Les liposomes homogènes présentent les mêmes propriétés de décomplexation rapide et une faible augmentation de fluorescence est observée après ajout de polyphosphates (agents réducteurs). En présence d'ADN ou d'ARNm, quel que soit le type cellulaire, les liposomes homogènes ont montré une activité luciférase faible ainsi qu'un faible nombre de cellules transfectées. En présence de siRNA, une faible inhibition (20-40%) a été observée.

Conclusion : La nature du bras espaceur dans le colipide a un impact sur l'efficacité de transfection car des différences ont été observées entre les liposomes homogènes et hybrides. Nous avons démontré que les complexes hybrides (**CLP : HLN** ou **CLN : HLP**) ont été moins affectés par le changement de milieux que les complexes homogènes (**CLN : HLN** ou **CLP : HLP**). La liaison de l'ADN est plus forte avec les liposomes hybrides que dans les systèmes homogènes. Ces observations ont été directement traduites dans les expériences de transfection *in vitro*. Les liposomes hybrides (**CLP : HLN** ou **CLN : HLP**) fournissent une transfection significativement plus élevée que les liposomes homogènes (**CLN : HLN** ou **CLP : HLP**), indépendamment du type cellulaire, du type d'acides nucléiques ou de la protéine codée. Les deux liposomes hybrides semblent être des systèmes de transfection efficaces et affichent une puissance de transfection comparable. Toutefois, il a été montré notamment pour l'ARNm que **CLP : HLN** offre une orientation spatiale plus favorable que **CLN : HLP**, se traduisant par une meilleure transfection. Les résultats de caractéristiques morphologiques

et de mesures biologiques suggèrent que l'organisation de la bicouche lipidique dans les lipoplexes est cruciale pour fournir une délivrance efficace d'acides nucléiques.

**L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de la publication suivante dans la revue *Journal of Controlled Release*.**





## Self-assembling complexes between binary mixtures of lipids with different linkers and nucleic acids promote universal mRNA, DNA and siRNA delivery

Thibault Colombani<sup>a,1</sup>, Pauline Peuziat<sup>a,1</sup>, Laurence Dallet<sup>b</sup>, Thomas Haudebourg<sup>a</sup>, Mathieu Mével<sup>a</sup>, Mathieu Berchel<sup>c</sup>, Olivier Lambert<sup>b</sup>, Damien Habrant<sup>d</sup>, Bruno Pitard<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> CRCINA, INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>b</sup> CBMN UMR-CNRS 5248, Université de Bordeaux IPB, Pessac, France

<sup>c</sup> UMR CNRS 6521, IFR 148 ScInBioS, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, Brest, France

<sup>d</sup> In-Cell-Art, Nantes, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 September 2016

Accepted 28 January 2017

Available online 01 February 2017

#### Keywords:

Non-viral nucleic acids transfer

Cationic lipids

Helper lipids

Liposomes

In vitro transfection

Physico-chemical properties

### ABSTRACT

Protein expression and RNA interference require efficient delivery of DNA or mRNA and small double stranded RNA into cells, respectively. Although cationic lipids are the most commonly used synthetic delivery vectors, a clear need still exists for a better delivery of various types of nucleic acids molecules to improve their biological activity. To optimize the transfection efficiency, a molecular approach consisting in modifying the chemical structure of a given cationic lipid is usually performed, but an alternative strategy could rely on modulating the supramolecular assembly of lipidic lamellar phases sandwiching the nucleic acids molecules. To validate this new concept, we synthesized on one hand two paromomycin-based cationic lipids, with either an amide or a phosphoramidate linker, and on the other hand two imidazole-based neutral lipids, having as well either an amide or a phosphoramidate function as linker. Combinations of cationic and helper lipids containing the same amide or phosphoramidate linkers led to the formation of homogeneous lamellar phases, while hybrid lamellar phases were obtained when the linkers on the cationic and helper lipids were different. Cryo-transmission electron microscopy and fluorescence experiments showed that liposomes/nucleic acids complexes resulting from the association of nucleic acids with hybrid lamellar phases led to complexes that were more stable in the extracellular compartment compared to those obtained with homogeneous systems. In addition, we observed that the most active supramolecular assemblies for the delivery of DNA, mRNA and siRNA were obtained when the cationic and helper lipids possess linkers of different natures. The results clearly show that this supramolecular strategy modulating the property of the lipidic lamellar phase constitutes a new approach for increasing the delivery of various types of nucleic acid molecules.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Synthetic delivery systems represent today an attractive and well-documented approach for the intracellular delivery of recombinant

informative macromolecular drugs including proteins and nucleic acids [1,2]. Among synthetic vectors used to deliver nucleic acids inside the cells, cationic lipids are recognized as a classical and versatile family of nanocarriers [3].

The usual approach applied until now to optimize the transfection efficiency consisted in chemical modifications on the cationic lipid structure only [4,5]. Indeed, performing structure-activity relationship (SAR) is the strategy of choice in the field of medicinal chemistry for the “hit-to-lead” approach and has proven its efficacy in various applications such as enzyme inhibition, taking advantage of the fact that the drug of interest interacts directly with its target [6,7]. Regarding the design of cationic lipids used as delivery systems, a ceiling effect may have been reached with this SAR strategy. Indeed, almost 30 years after the pioneer work on the synthesis of the first cationic lipids [8] and even if great improvements have been achieved compared to the original molecules, the ultimate goal of identifying a unique and universal

**Abbreviations:** C2C12, mouse myoblast cell line; CR, charge ratios; CLN, cationic lipid with N-based linker; CLP, cationic lipid with P-based linker; Cryo-TEM, cryogenic transmission electron microscopy; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DNA, deoxyribonucleic acid; EtBr, ethidium bromide; eGFP, enhanced green fluorescent protein; HeLa, human cervical cancer cells; HLN, helper lipid with N-based linker; HLP, helper lipid with P-based linker; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; FACS, fluorescence activated cell sorting; Luc, luciferase; MEF, mouse embryonic fibroblasts; MEM, minimum essential medium; mRNA, messenger Ribonucleic acid; qRT-PCR, quantitative Real-Time PCR; RNAi, RNA interference; siRNA, small interfering RNA.

\* Corresponding author at: UMR 1232/CNRS ERL, IRS2, 22 bl Benoni Goullin 44200 Nantes, France.

E-mail address: [bruno.pitard@univ-nantes.fr](mailto:bruno.pitard@univ-nantes.fr) (B. Pitard).

<sup>1</sup> These authors equally contributed to this work.

delivery system able to efficiently transfect different classes of nucleic acids (DNA, mRNA, siRNA) into different cell lines or primary cells has not been reached yet. This situation probably results from the fact that cationic lipids do not act by themselves as “medical drugs” but represent only one piece of a complex process involving numerous steps that all need to be overcome to reach good levels of transfection.

The mechanism of gene delivery is known to proceed via i) formation of the lipoplex (complex nucleic acid + cationic lipid), ii) cellular uptake by endocytosis, iii) endosomal escape, iv) release of the nucleic acid from the complex and v) protein expression in the case of mRNA, protein inhibition in the case of siRNA in the cytosol, or nuclear uptake then protein expression in the case of DNA [9–14]. In addition, another difficulty for the discovery of an “universal” vector probably relies on identifying molecular features adapted to different structures of nucleic acids such as single or double stranded RNA and double stranded DNA that moreover possess different molecular weights.

The structure of cationic lipids used in the field of nucleic acid delivery is typically divided into three distinct parts i) a positively charged headgroup, able to electrostatically interact with nucleic acids, ii) an hydrophobic tail, to allow interactions with the cell membranes and iii) a linker (spacer) that links the head and the tail moieties together. Our team has developed a specific class of cationic lipids, using aminoglycoside-based headgroup. Aminoglycosides represent a family of natural products with a precise 3D-organization carrying several positively charged primary amines and having the property of naturally binding to nucleic acids [15–20]. We assessed different aminoglycosides (including paromomycin, neomycin, kanamycin and tobramycin) in previous studies and prepared various combinations of aminoglycoside/linker/hydrophobic part conjugates. The resulting amphiphilic molecules proved to be efficient vectors for the delivery of DNA, siRNA and more recently mRNA [21–24].

A well-known strategy to enhance transfection efficiency of a given cationic lipid relies in the incorporation of a neutral helper lipid in the nucleic acid formulation, forming cationic liposomes with binary mixtures of lipids in the liposomal membrane [25]. The helper lipids are known to facilitate the endosomal escape and display structural features comparable to cationic lipids (headgroup/linker/hydrophobic domain), except that the headgroup does not carry any positive charge. In the present study, we used helper lipids with an imidazole headgroup, based on encouraging results from the literature [26].

We hypothesized that the various steps of the transfection mechanism could be affected by the self-assembling properties of the complexes formed between cationic lipids (or liposomes) and nucleic acids, rather than the structure of the cationic lipids (or liposomes) themselves [9]. In these supramolecular assemblies, the nucleic acid molecules are sandwiched between lipid bilayers forming a lamellar organization of various periodicities [27–29]. The transfection pathway is governed by “membrane interactions”, as the membranes of the lipoplexes first interact with the cytoplasmic membranes for internalization, and then with the endosomal membrane to trigger the release of the transported molecules [10,12]. We believe that the gene delivery process could thus be optimized by taking advantage of a new strategy consisting in finely modulating the lamellar phases of the lipoplex membrane, in order to confer enhanced nucleic acids complexation and decomplexation properties, outside and inside the cells, respectively.

In a previous study on DNA transfection, we compared two different formulation systems made with the same cationic lipid whose structure consisted of a paromomycin headgroup, a dioleoyl hydrophobic backbone and a nitrogen-based linker (amide bond) [30]. Two imidazole-based helper lipids with either a nitrogen or a phosphorous-based linker were used to prepare liposomes. We discovered that better stability and higher DNA transfection were obtained when the hybrid liposomes (meaning with N-based linker on the cationic lipid and P-based linker on the helper lipid) were used compared to homogeneous liposomes (with N-based linkers both on the cationic and helper lipids).

These interesting preliminary observations prompted us to further investigate on these types of supramolecular assemblies. In the present study we assessed the systems formed by the combination of two paromomycin-based cationic lipids and two neutral imidazole-based helper lipids with three types of nucleic acids, DNA, mRNA and siRNA. It is known that binary mixtures of lipids with different hydrophobic backbone (nature, chain length and/or insaturations) can give rise to spatial separation of phase domains in the membranes; we therefore decided to maintain the same hydrophobic moiety for the cationic and the helper lipids and selected a dioleoyl backbone for this study. Regarding the linker, two bio-inspired functions consisting of either an amide (nitrogen-based) or a phosphoramidate (phosphorous-based) bond were used to link the polar and the lipophilic parts together.

The combinations polar headgroup/linker/hydrophobic tail provided four molecules that were evaluated; two cationic lipids: **CLN** (cationic lipid with nitrogen-based linker) and **CLP** (cationic lipid with phosphorous-based linker), and two helper lipids: **HLN** (helper lipid with nitrogen-based linker) and **HLP** (helper lipid with phosphorous-based linker). With these four molecules, supramolecular assemblies consisting of associations of the two cationic lipids with the two neutral lipids led to either homogeneous lamellar phases (when the two lipids have the same linker, **CLN:HLN** and **CLP:HLP**) or hybrid ones (when the linkers on the two lipids are different, **CLN:HLP** and **CLP:HLN**).

The major objective of the work was to understand how the physico-chemical properties of the lipoplexes can affect the stability and the transfection efficiency of nucleic acids and to decipher the potential “universal” transfection properties of these types of liposomal formulations.

## 2. Materials and methods

pGWIZ-Luc (Genlantis, San Diego, CA) is a plasmid encoding the luciferase reporter gene under the control of the human cytomegalovirus immediate-early gene promoter. pGWIZ-eGFP (Clontech, Mountain View, CA) is a plasmid encoding green fluorescent protein reporter gene, under the control of the human cytomegalovirus immediate-early gene promoter. Plasmids were purified from recombinant *Escherichia coli* by means of Endofree plasmid purification columns (Qiagen, Venlo, Netherlands).

mRNA encoding the luciferase and the green fluorescent protein were purchased from Trilink Biotechnologies (San Diego, CA).

Human anti-laminA/C siRNA (sc-35,776) was purchased in Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas) and murine anti-laminA/C siRNA (sense sequence: GGA-CCU-CGA-GGC-UCU-UCU-C) was obtained from Eurogentec (Seraing, Belgium).

## 3. Lipids synthesis

All reagents were purchased from Acros Organics or Sigma-Aldrich and were used without further purification. Reactions requiring anhydrous conditions were performed under nitrogen. NMR experiments were recorded on a Bruker Advance 400 MHz spectrometer (400 MHz for  $^1\text{H}$ , 100 MHz for  $^{13}\text{C}$  and 162 MHz for  $^{31}\text{P}$ ). Spectra were acquired at 300 K, using deuterated methanol (MeOD) as solvent. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm); coupling constant are reported in units of Hertz [Hz]. The following abbreviations were used: s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded with a qTOF Synaptg2 HDMS (Waters Corporation) apparatus; electrospray in positive mode was used. All the products were purified by flash chromatography (GRACE REVELERIS Flash Chromatography System) equipped with UV and DLS detectors. The purity of **CLP** was controlled by HPLC using UPLC H-Class from Waters using a gradient of  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.1% Formic acid and  $\text{CH}_3\text{CN}$ .



### 3.1. Teoc-protected CLP (5)

**4** (100 mg, 0.17 mmol) and **2** (205 mg, 0.17 mmol) were dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , then triethylamine (24  $\mu\text{L}$ , 0.17 mmol) and  $\text{CBrCl}_3$  (18.6  $\mu\text{L}$ , 0.19 mmol) were added at 0 °C under nitrogen atmosphere. The reaction was stirred 30 min at 0 °C and overnight at 20 °C. After washing with water (2  $\times$  50 mL) and with brine (50 mL), the organic phase was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, evaporated and purified by flash chromatography on silica column ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  100/0 to 80/20) to give the desired compound as white solid (226 mg, 75% yield).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 5.39–5.28 (m, 4H), 5.17–4.96 (m, 2H), 4.6 (m, 2H), 4.20–4.05 (m, 10H), 4.03–3.94 (m, 5H), 3.91–3.75 (m, 5H), 3.70–3.35 (m, 13H), 3.21–3.07 (m, 2H), 2.04–1.98 (m, 8H), 1.72–1.66 (m, 4H), 1.46–1.22 (m, 44H), 1.06–0.97 (m, 8H), 0.91 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 6H), 0.07–0.05 (m, 36H).  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 9.04 ppm. HRMS for  $\text{C}_{83}\text{H}_{162}\text{N}_5\text{O}_{25}\text{Si}_4\text{PNa}$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ , calculated 1795.0096; found 1795.0271.

### 3.2. CLP

Compound **5** (150 mg, 0.085 mmol) was dissolved in DCM (3 mL). TFA (2 mL) was added at 0 °C under nitrogen atmosphere. The reaction was stirred 30 min at 0 °C and 1 h at 20 °C. After concentration, purification by reverse-phase flash chromatography ( $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA/MeOH 100/0 to 0/100) and lyophilization, the desired compound was obtained as white powder (133 mg, 95% yield).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 5.54 (d,  $J$  = 3.6 Hz, 1H), 5.39–5.34 (m, 4H), 5.2 (m, 1H), 4.45 ( $t_{\text{app}}$ ,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 4.33–4.31 (m, 1H), 4.19–4.14 (m, 2H), 4.02–3.96 (m, 5H), 3.92–3.89 (m, 2H), 3.83–3.78 (m, 4H), 3.67–3.60 (m, 3H), 3.51–3.46 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.26–3.10 (m, 5H), 2.48–2.40 (m, 1H), 2.09–1.95 (m, 7H), 1.87–1.79 (m, 1H), 1.71–1.67 (m, 4H), 1.42–1.30 (m, 44H), 0.90 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C):  $\delta$  = 130.9, 130.8, 111.3, 98.6, 97.2, 85.5, 83.4, 81.2, 76.9, 76.1, 76.0, 75.5, 74.1, 17.8, 70.8, 69.3, 68.1, 62.4, 60.9, 55.7, 53.2, 51.3, 30.7, 42.2, 33.6, 33.0, 31.5, 31.4, 30.9, 30.8, 30.6, 30.4, 30.3, 30.2, 28.2, 28.1, 26.8, 23.7, 14.4 ppm;  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 9.03 ppm; HRMS for  $\text{C}_{59}\text{H}_{115}\text{N}_5\text{O}_{17}\text{P}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ , calculated 1196.8053; found 1196.8026.

## 4. Cationic liposomes formulations

Liposomes formulations were made as previously described with a cationic lipid (CLN or CLP) and a helper lipid (HLN or HLP) at a molar ratio of 1:1 [23]. Briefly, liposomes were prepared by the lipid film hydration technique. Both lipids and helper lipids were placed in a round bottom flask and a dry lipid film was made by a slow rotary evaporation of the solvent. The dry lipid film was then hydrated with  $\text{H}_2\text{O}$  overnight at 4 °C. The final lipid solution was sonicated for 15 min to ensure a uniform and appropriate particle size (around 180 nm).

## 5. Preparation of lipoplexes

Nucleic acids-liposomes complexes were formed by vigorously mixing equal volumes of the nucleic acids solution with the liposomes solution, at the suitable concentration leading to different charge ratios ( $\pm$ ). Lipoplexes were prepared in NaCl 150 mM. For transfection experiments, 0.5  $\mu\text{g}$  of DNA or mRNA and 0.15  $\mu\text{g}$  of siRNA were used.

## 6. Cryogenic transmission electron microscopy

CryoTEM imaging of cationic lipid/DNA complexes were performed as previously described. Complexes are formulated in 150 mM NaCl or DMEM and a 5  $\mu\text{L}$  sample drop was applied to 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, with a FEI Tecnai F20 electron microscope

operating at 200 kV. Images were recorded with a 2 k  $\times$  2 k USC1000 CCD camera (Gatan) at a nominal magnification of 50,000 $\times$  under low-dose conditions.

## 7. DNA release

In order to follow the progress of DNA release, we used residual ethidium bromide (EtBr) fluorescence measurements carried out on a Jobin-Yvon spex Fluoromax-4 spectrofluorometer (Horiba Jobin Yvon, Kyoto, Japan). Residual fluorescence displayed upon intercalation between non-complexed DNA base pairs was monitored (excitation, 260 nm; emission, 560 nm). DNA-lipids complexes (1 mL at 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of DNA) were formed in NaCl 150 mM final concentration, or 10 mM Hepes (pH 7.2). The kinetics of increase in EtBr fluorescence was monitored after the rapid addition of 10  $\mu\text{L}$  of a solution containing polyphosphates (Sodium hexametaphosphate) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO), at a concentration of 4 mg/mL. A magnetic stirrer at the bottom of the quartz cell ensured the homogenization of the solution.

## 8. Cell culture

The transfection activity of the various vectors was evaluated in transient transfection experiments on human cervical cancer cell line (HeLa), murine myoblast cell line (C2C12), and mouse embryonic fibroblast cell line (MEF) as well as in primary cells as in rat aorta smooth muscle cells and human fibroblasts. Cells were grown at 37 °C in a humidified 5%  $\text{CO}_2/95\%$  air incubator.

The medium used for HeLa, C2C12 and rat aorta smooth muscle cells was Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Life Technologies, Carlsbad, CA), with a glucose concentration of 4.5 g/L for the HeLa and C2C12 or 1 g/L for the rat aorta smooth muscle cells, supplemented with Fetal Calf Serum 10% (v/v), 2 mM L-glutamine 1% (v/v) and antibiotics (penicillin/streptomycin) 1% (v/v). MEF cells were cultivated in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMEM) (Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with Fetal Calf Serum 10% (v/v), MEM (minimum essential medium) Non-Essential Amino Acids (Life Technologies, Carlsbad, CA) 1% (v/v) and antibiotics (penicillin/streptomycin) 1% (v/v). The medium used for human fibroblasts was DMEM with a glucose concentration of 4.5 g/L, with Glutamax<sup>TM</sup>, supplemented with HyClone<sup>TM</sup> Fetal Bovine Serum (Life Technologies, Carlsbad, CA) 10% (v/v), MEM Non-Essential Amino Acids 1% (v/v) and Sodium Pyruvate 1% (v/v).

## 9. In vitro cell transfection

The day before transfection, cellular suspensions of 1 mL were seeded into 24-well culture plates to reach a final concentration resulting in approximately 70% confluence after 24 h. Thirty minutes before transfection, medium was removed and replaced by 450  $\mu\text{L}$  of fresh complete medium. Then, lipoplexes solution (50  $\mu\text{L}$ ) prepared 15 min before, containing 0.5  $\mu\text{g}$  of plasmid DNA or mRNA, or 0.15  $\mu\text{g}$  siRNA was added to each well.

Cells were cultured for an additional 24 h before gene expression or inhibition was determined.

Luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System kit (Promega, Madison, WI) according to manufacturer's recommendations. Briefly, the cells layers were rinsed with 500  $\mu\text{L}$  of PBS and lysed with 300  $\mu\text{L}$  of Reporter Lysis Buffer 1 $\times$  (Promega, Madison, WI) supplemented with complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Sciences, Penzberg, Germany). To ensure cell lysis, cells were subjected to a freezing cycle overnight. Then cell lysates were centrifuged at 10,000rpm for 5 min, and 20  $\mu\text{L}$  of supernatant were assayed for luciferase activity using Promega luciferase substrate. Luminescence was recorded on a victor X-3 multilabel plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA). All measurements were performed in duplicate.

For flow cytometry experiments, cells were rinsed, collected and re-suspended in phosphate buffer saline (PBS) with 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA). The resulting cell suspension was assayed for GFP expression by flow cytometer analysis using a LRS II flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). The percentage of GFP positive cells and the mean fluorescence intensity were determined using the flow cytometer program.

For gene silencing experiment, cells were washed after 24 h of incubation, lysed using the NucleoSpin® RNA/Protein assay (Macherey Nagel, Düren, Germany) to purify RNA and quantified with NanoDrop 1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). RT-qPCR were then realized in 2 phases. First, reverse transcriptions of RNA in cDNA were conducted using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Life technologies) on GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler (Life technologies). Then, the expression of laminA/C and HPRT was quantified by Real-time PCR using Taqman® Gene expression assays on StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life technologies). Results were normalized against the expression levels of endogenous HPRT and expressed according to the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formula. Probes used to amplify specific gene products from human or murine cDNA (Life technologies) were Hs00153462\_m1 for human laminA/C, Hs99999909\_m1 for human HPRT, Mm00497783\_m1 for murine laminA/C and Mm00446966\_m1 for murine HPRT.

## 10. In vitro cytotoxicity

For in vitro cytotoxicity experiments, cells were transfected as described above, with lipoplexes containing 0.5  $\mu\text{g}$  of DNA. After 24 h of incubation, the amount of viable cells was assayed using Annexin V staining protocol (eBioscience, San Diego, CA). Cells were treated as recommended by the manufacturer and the results were analyzed using a BD™ LRS II flow cytometer (Becton Dickinson).

## 11. In vivo transfection in animal model

Swiss mice (Elevage Janvier, Le Genest, France) were housed in conventional conditions according to INSERM guidelines. Mice aged 8 weeks were used for experiments. For intramuscular (i.m.) luciferase reporter gene transfection, mice were anesthetized by isoflurane inhalation, then different DNA-hybrid and homogeneous liposomes formulations were injected into both *tibialis anterior* muscles using an Insmed Pic Indolore 30G syringe (Artsana, Grandate, Italy). Two sites were injected per animal, 10  $\mu\text{g}$  DNA doses are given per *tibialis anterior*. After seven days *tibialis anterior* muscles were dissected, and immediately frozen in liquid nitrogen. Luciferase expression was then quantified in muscle extracts using the Luciferase Assay System kit (Promega, Madison, WI), according to the manufacturer's protocol.

## 12. Statistical analysis

Data were recorded as mean  $\pm$  standard deviation, which were calculated with the Prism program (GraphPad Software, La Jolla, CA). The significance of differences between groups was assessed using a Mann Whitney test when two groups were compared. A p value less than 0.05 indicated a statistically significant difference.

## 13. Results

### 13.1. Synthesis

As stated previously, we used two different cationic lipids with a paromomycin headgroup, a dioleil hydrophobic backbone and either a N-based or a P-based linker (**CLN** and **CLP**), and two different helper lipids with an imidazole headgroup, a dioleil hydrophobic backbone and either an N-based or a P-based linker (**HLN** and **HLP**).

**CLN** (also known as DOSP) [22], **HLN**<sup>30</sup> and **HLP** (also known as MM-27) [31] were prepared using described procedures. The synthetic route for the preparation **CLP** is depicted in Fig. 1. The hydrophobic part *O,O*-dioleilphosphite **2** was prepared by a transesterification-like reaction between *O,O*-diphenylphosphite **1** and oleyl alcohol [32]. For the polar headgroup, the synthesis started with paromomycin sulfate **3**, and after a 3-step sequence previously described involving protecting group manipulations, the adduct **4** was obtained [22]. **2** and **4** then reacted under Atherton-Todd conditions [33] to provide the conjugate **5** with a phosphorous linker between the aminoglycoside and the hydrophobic moieties. Finally, the Teoc protecting groups were removed by treatment of **5** with trifluoroacetic acid to afford **CLP** as its TFA salt.

With these four molecules in hands, we next examined the behavior of the supramolecular assemblies formed by complexing nucleic acids with each of the four different combinations of liposomes: **CLN:HLN** (homogeneous "NN" liposomes), **CLP:HLP** (homogeneous "PP" liposomes), **CLN:HLP** (hybrid "NP" liposomes) and **CLP:HLN** (hybrid "PN" liposomes). The various liposome structures are depicted in Fig. 2, where neutral lipids are intercalated between cationic lipids and dioleil chains interact with each other to form the lipidic membrane, leaving the positive charges of paromomycin at the surface of the liposomes.

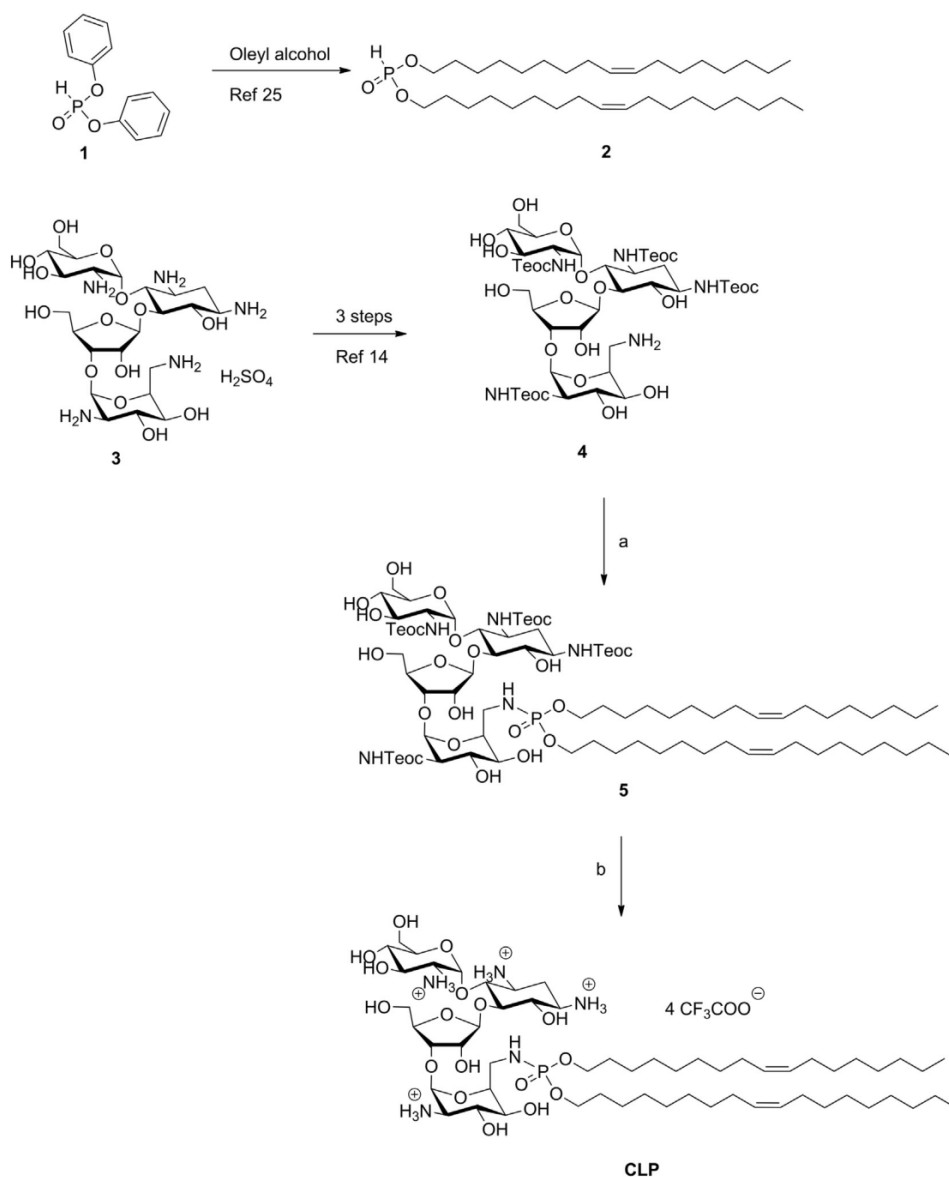
### 13.2. Physicochemical characterization by cryoTEM

Lipoplexes were generated by mixing plasmid DNA with the four liposome combinations and were observed by cryoTEM in NaCl 150 mM media (Fig. 3A–D). With both **CLN:HLP** and **CLP:HLN** hybrid liposomes, lipoplexes showed heterogeneous assemblies (Fig. 3A and D). These structures appeared as stacks of several lipid layers separated by electron-dense layers likely corresponding to DNA molecules. In these complexes, the DNA appeared to be strongly bound to the lipid membranes. The observations were different with **CLN:HLN** and **CLP:HLP** homogeneous liposomes, as lipoplexes in these cases appeared as smaller aggregates of short grapes displaying polymorphic structures (Fig. 3B and C). No stacks of layers of lipid and DNA were visible, suggesting that DNA was not fully entrapped between lipidic bilayers. This was confirmed by the observation of few empty liposomes and some free DNA fragments at the vicinity of the liposomes (Fig. 3B, black arrow).

These observations in the regular complexation media NaCl prompted us to further investigate the structure of the liposomes in a more complex media mimicking the extracellular conditions. We anticipated that the differences observed between homogeneous and hybrid liposomes could be amplified in a cell culture medium like DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) that is composed of high contents of amino acids and vitamins. We therefore repeated the previous experiment replacing NaCl by DMEM media and observed by cryoTEM the structures of the DNA/liposomes complexes (Figs. 3E–H). Lipoplexes prepared from homogeneous liposomes **CLN:HLN** and **CLP:HLP** presented a significant difference compared to NaCl and a well-defined onion-like organization with concentric layers of lipids was observed (no DNA was intercalated, Fig. 3F and G). Observation of the external layer revealed that the DNA fragments were located at the surface (black arrows). With hybrid liposomes **CLN:HLP** and **CLP:HLN** (Fig. 3E and H), the complexes were less affected by the media replacement and complexes with various morphologies were observed, with DNA molecules strongly entrapped inside the lipoplexes.

### 14. DNA release

Then, we investigated whether the four types of supramolecular assemblies could have different DNA decomplexation properties. After adding small anionic polyphosphates (consisting of 6 phosphate units) to the complexes formed between DNA and the different liposomes, we could determine the decomplexation properties of the different supramolecular assemblies by measuring the ethidium bromide fluorescence.



**Fig. 1.** Synthesis of CLP via the Atherton-Todd reaction. Reagents and conditions: a) 2, DCM, Et<sub>3</sub>N, CBrCl<sub>3</sub>, 75%, b) TFA, DCM, 95%.

The initial state ( $t = 0$  s) showed some differences between homogeneous and hybrid liposomes. Indeed for the hybrid liposomes (**CLN:HLP** and **CLP:HLN**), the fluorescence was close to 0, indicating that the DNA was fully complexed and not accessible by EtBr, while some fluorescence was already detected for the homogeneous liposomes (**CLP:HLP** and **CLN:HLN**). This is in good agreement with what was observed in the electron microscopy experiment, as for homogeneous liposomes some DNA fragments were observed as non-complexed and therefore were suitable for EtBr intercalation.

Measuring the kinetics of decomplexation upon polyphosphate addition at a pH 7.1 indicated that depending on the supramolecular assemblies, the decomplexation behaviors were also different. Indeed, in these conditions the two homogeneous liposomes **CLN:HLN** and **CLP:HLP** display the same rapid decomplexation properties and a quick increase in the fluorescence was monitored few seconds after the polyphosphates addition (at  $t = 45$  s, Fig. 4). This indicates that

DNA complexes were not robust, since ethidium bromide was able to be intercalated in the base pairs of DNA that were liberated from the complexes after the addition of polyphosphates. By contrast, for DNA complexes with the two hybrid liposomes **CLN:HLP** and **CLP:HLN**, the fluorescent signal remained stable at a low level even after addition of the polyphosphates, showing that the DNA binding in these supramolecular assemblies was strong enough to resist to these decomplexing conditions.

#### 14.1. *In vitro* nucleic acids transfection

The transfection efficiency of the different liposomes was then evaluated on three cell lines and in more challenging to transfect primary cells. In order to be able to draw general conclusions on nucleic acid delivery rather than focusing on a specific format, we decided to



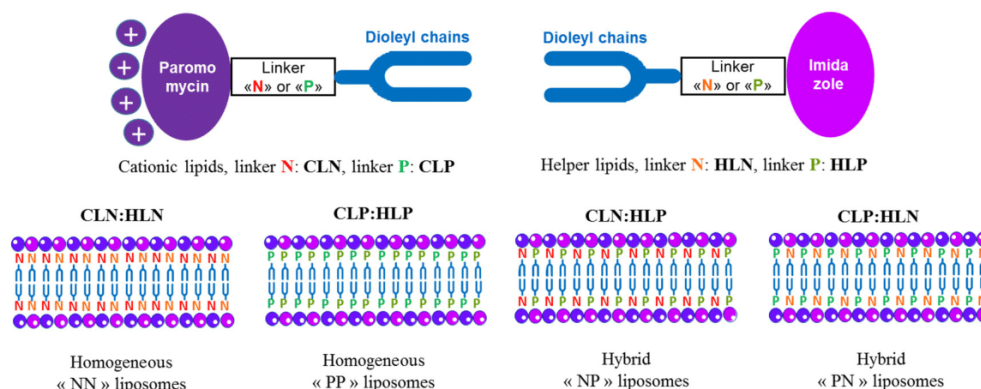


Fig. 2. Schematic representation of the different lipid supramolecular assemblies.

investigate the delivery potential of the four liposomes with 3 different types of nucleic acids: DNA, mRNA and siRNA.

14.1.1. *In vitro* delivery of plasmid DNA in different cell types

We first evaluated the transfection potency of the four liposomes formulating a plasmid DNA encoding firefly luciferase in different cell types: HeLa (Fig. 5A), C2C12 (Fig. 5B), mouse embryonic fibroblast (MEF, Fig. 5C), rat aorta muscle cells (Fig. 5D) and human fibroblasts (Fig. 5E). In all tested conditions, cells transfected with hybrid liposomes **CLN:HLP** (black bars, left) or **CLP:HLN** (black bars, right) showed higher luciferase activity than those transfected with homogenous liposomes **CLN:HLN** (grey bars, left) and **CLP:HLP** (grey bars, right). These results clearly indicate that the nature of the linker in the helper lipid has a huge impact on the transfection efficiency, since independently of the cationic lipids structure (either **CLN** or **CLP**), statistically significant differences in luciferase expression levels were observed between homogeneous and hybrid liposomes. Taken together, both hybrid liposomes appeared to be efficient transfection systems and displayed comparable transfection potency.

In order to further validate those observations on DNA transfection efficacy, we measured by cell cytometry the percentage of transfected cells using GFP encoding plasmid formulated with the different liposomes, in HeLa (Fig. 6A), C2C12 (Fig. 6B), MEF (Fig. 6C) and rat aorta muscle cells (Fig. 6D). Fig. 6A reveals that HeLa cells showed about 40% of GFP positive cells transfected with the two hybrid liposomes

**CLN:HLP** and **CLP:HLN** compared to approximately 20% GFP expressing cells transfected with the homogeneous liposomes **CLN:HLN** and **CLP:HLP**. Trends were comparable with the other cell types and the best results for each cell type were always obtained with the hybrid liposomes, with approximately 25% of GFP positive C2C12 and MEF cells and 15% of rat aorta smooth muscle cells expressing GFP with the best conditions. In this set of experiments, no noticeable difference was detected between the two hybrid liposomes.

It should be noted here that these transfection results were obtained in non-optimized conditions, as the objectives of the study rely on understanding the differences between hybrid and homogeneous liposomes, rather than improving the transfection potency of one specific delivery system.

The obtained results in these DNA transfection experiments confirmed our preliminary results [30], indicating that the best combination in a liposomal formulation is seen when the linkers on the cationic and helper lipids are of different natures. In order to go deeper in the analyses of these formulation systems, we decided to investigate if this behavior was specific to DNA or would be applicable also to other types of nucleic acids.

14.1.2. *In vitro* delivery of mRNA in different cell lines

We then evaluated the transfection efficiency of another class of nucleic acids as we assessed the formulation of the cationic liposomes with mRNA encoding luciferase (Fig. 7). The mRNA transfection was

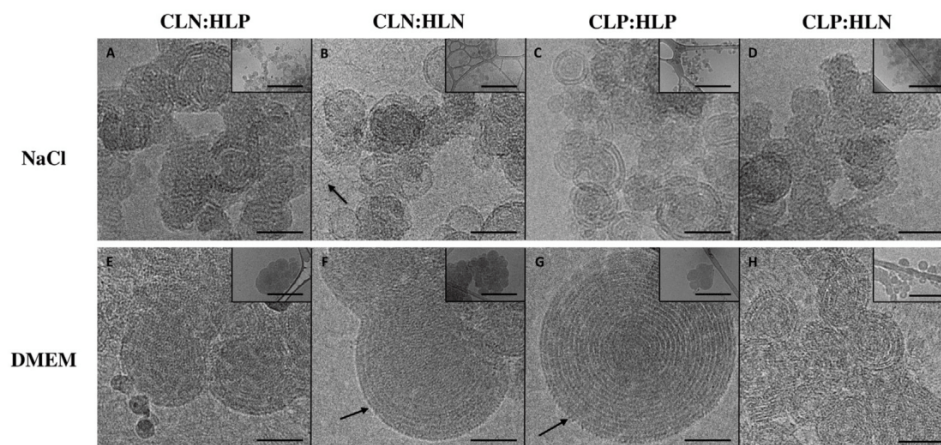
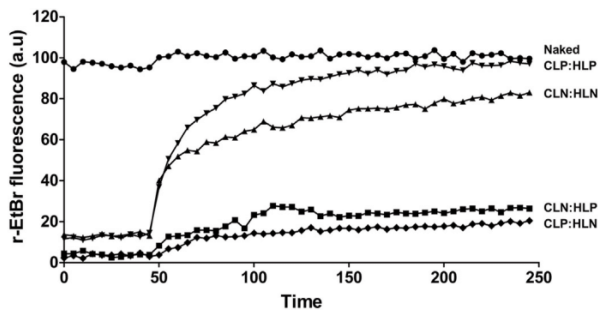


Fig. 3. Cryo-TEM images of cationic liposomes/DNA complexes in NaCl 150 mM (A–D) and in DMEM (E–H). DNA was complexed with liposomes of CLN:HLP (A and E), CLN:HLN (B and F), CLP:HLP (C and G) or CLP:HLN (D and H). Black arrow denote free DNA fragment. Insets: a large field of view of each condition. Scale bars 50 nm (inset 0.5 μm).



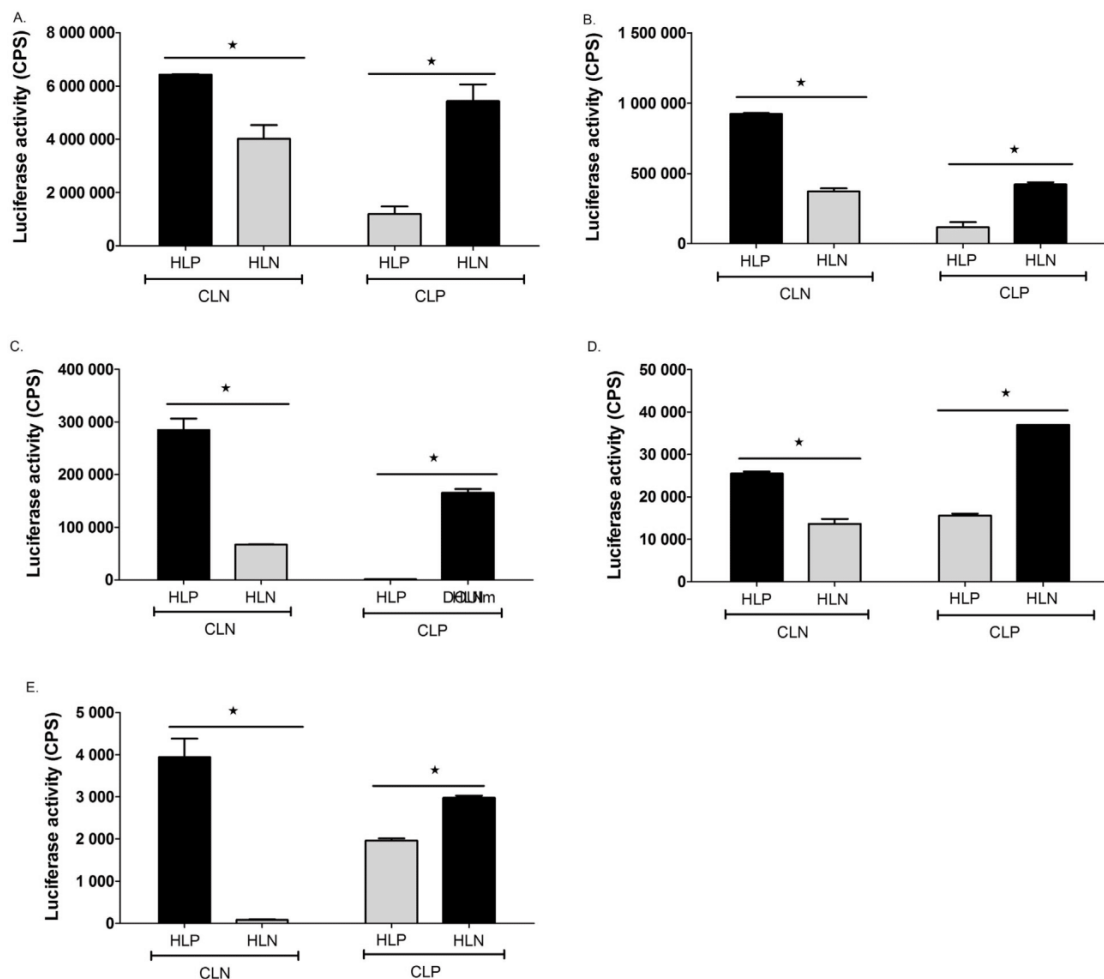
**Fig. 4.** Modelisation of the DNA release by the liposomes at extracellular pH. The compaction of DNA by cationic lipids was monitored by the exclusion of ethidium bromide (EtBr) molecules from the complexes. 4 µg of EtBr were added to DNA-lipids complexes (2 mL). The residual EtBr fluorescence was assayed using a Jobin-Yvon spex Fluoromax-4 spectrofluorimeter. Complexes CLN:HLN (triangle), CLP:HLP (inverted triangle), CLN:HLP (square) and CLP:HLN (diamond) were obtained by mixing cationic liposomes with 10 µg of plasmid DNA, at pH = 7.1. Naked DNA was used as a control (circle). Solutions were buffered with HEPES buffer 10 mM, NaCl 150 mM (pH 7.1). At t = 45 s, release of DNA from cationic lipids was induced by adding 10 µL of a polyphosphate solution at 4 mg/mL to the complexes.

assessed on different cell lines: HeLa (Fig. 7A), C2C12 (Fig. 7B), MEF (Fig. 7C), rat aorta smooth muscle cells (Fig. 7D) and human fibroblasts (Fig. 7E). The results confirmed the previous observations made for DNA, as for a given cationic lipid **CLN** or **CLP** and independently of the cell types, the best transfections were in all cases obtained for the hybrid liposomes when comparing to the homogenous versions (**CLN:HLP** vs **CLN:HLN** and **CLP:HLN** vs **CLP:HLP** respectively). Comparing the relative efficacy of the two hybrid systems, we could observe for the five cell types that the highest luciferase expression was obtained with the **CLP:HLN** system.

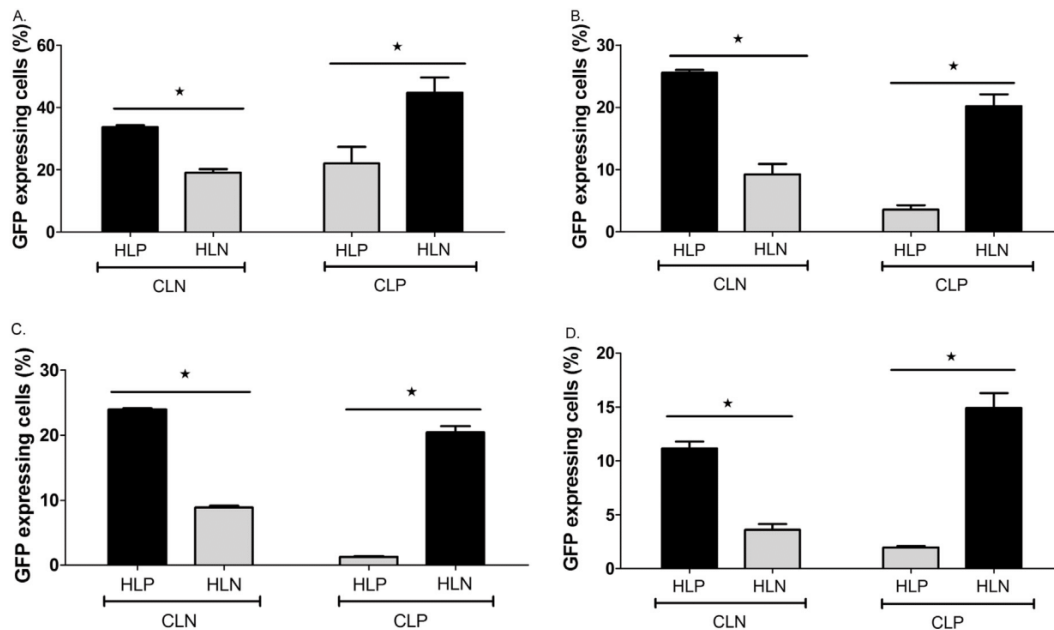
To better assess the efficacy of the hybrid liposomes for mRNA transfection, we transfected cells with mRNA encoding GFP and observed live cells after 24 h by microscopy (Fig. 8). The results confirmed what was obtained with luciferase mRNA, as the highest transfection was obtained with the hybrid liposome **CLP:HLN**. Both hybrid liposomes displayed much higher transfection compared to homogeneous liposomes (compare **CLN:HLP** with **CLN:HLN** and **CLP:HLN** with **CLP:HLP**, respectively).

#### 14.1.3. Gene silencing experiments

In order to complete the picture for the compatibility of these delivery systems with different types of nucleic acids, we next performed



**Fig. 5.** Plasmid DNA encoding luciferase transfection, in various cell types, in NaCl 150 mM. HeLa cells (A), C2C12 cells (B), MEF cells (C), or rat aorta smooth muscle cells (D), and human fibroblasts (E) were transfected with 0.5 µg of plasmid DNA, encoding luciferase, complexed in NaCl 150 mM with a cationic lipid (CLN or CLP) associated with a helper lipid (HLN or HLP). Plates were incubated 24 h before cells lysis and luciferase activity measurement.



**Fig. 6.** Percentage of GFP expressing cells after a plasmid DNA transfection, in NaCl 150 mM. HeLa cells (A), C2C12 cells (B), MEF cells (C), or rat aorta smooth muscle cells (D) were transfected with 0.5  $\mu$ g of plasmid DNA, encoding GFP, complexed in NaCl 150 mM with a cationic lipid (CLN or CLP) associated with a helper lipid (HLN or HLP). Plates were incubated 24 h before FACS analysis.

experiments to determine which liposomal formulation was the most adapted for RNAi experiments. Results in Fig. 9 indicated that after formulation of siRNA with the different liposomes, the best inhibition was in turn obtained with the hybrid versions, with consistently around 50% inhibition for both **CLN:HLP** and **CLP:HLN** on HeLa and C2C12 cells. For the homogeneous liposomes **CLN:HLN** and **CLP:HLP**, the inhibition ranged between 20 and 40% for both cell types. Again, the inhibitions observed here were obtained in non-optimized conditions in order to reveal more easily the differences between hybrid and homogeneous liposomes.

#### 14.1.4. Cell viability

The four liposomes were next tested for their toxicity into HeLa cells with the Annexin V staining protocol (Fig. 10). Results showed that the toxicity was very low for the four studied liposomes - homogeneous and hybrid - with a cell viability superior to 90% in all conditions.

#### 14.1.5. In vivo transfection efficiency in animal model

In order to strengthen the results obtained in vitro with different nucleic acids, we performed in vivo experiments in an animal model. Wild type mice were injected intramuscularly with DNA encoding luciferase with hybrid liposomes **CLN:HLP** (black bars, left) or **CLP:HLN** (black bars) and homogeneous liposomes **CLN:HLN** (grey bars, left) and **CLP:HLP** (grey bars, right). After 7 days, luciferase expression in injected muscles (Fig. 11) was higher with hybrid liposomes compared to homogeneous ones. This result clearly shows that hybrid liposomes have also enhanced transfection capabilities not only in vitro but also in vivo.

## 15. Discussion

In the present study, the objective was to optimize the nucleic acids synthetic delivery systems and demonstrate the essential role of the liposomal membrane to ensure an efficient transfection process. Our approach relied on supramolecular tuning of the liposomes formed by association of a cationic lipid with a helper lipid. In this purpose, we

have synthesized two cationic lipids with a paromomycin headgroup, a dioleoyl hydrophobic moiety and either an N-based or a P-based linker (**CLN** and **CLP**, respectively) and two neutral lipids with an imidazole headgroup, a dioleoyl hydrophobic moiety and either an N-based or a P-based linker (**HLN** and **HLP**, respectively). Association of the cationic and helper lipids led to two homogeneous (**CLN:HLN** and **CLP:HLP**) or two hybrid (**CLN:HLP** and **CLP:HLN**) liposomes.

The results of the cryoTEM experiments and the decomplexation studies provided interesting data on the structural differences between homogeneous and hybrid assemblies. We observed that coordinating or not the nature of the linkers in the cationic and helper lipids had a great impact on the structure of the lipoplexes and on the DNA binding. For complexes where weak bonds between the cationic liposomes and the DNA were observed (homogeneous liposomes), we demonstrated that the complexation media has a huge influence on the structure. The liposomes assembled themselves in concentric layers in DMEM media, as they will probably do in the absence of DNA. This indicated that the architecture of the complexes was dictated by the external environment. The situation was very different with hybrid liposomes: as the DNA was strongly bound to the complexes, the complexation media only had a limited impact. In this case, the driving force of the complex architecture was directly related to the binding force between cationic liposomes and DNA molecules.

Regarding the relative stability of the DNA molecules inside the complexes, the observations made were somewhat surprising. Indeed, the DNA binding was stronger in the case of hybrid liposomes compared to homogeneous systems. This somewhat contradicts the dogma that well organized architectures are preferred to induce higher stability of DNA complexes. These results can however be rationalized. Indeed, the main property that confers DNA stability relies on electrostatic interactions between the positively charged headgroup of the cationic lipid and the negatively charged phosphate moieties of the DNA molecules. When the cationic lipids are part of highly organized membranes (NN or PP liposomes), their polar headgroup is “frozen” in the structure and therefore possess a reduced degree of mobility to interact with DNA. On the other hand, membranes of NP or PN liposomes present



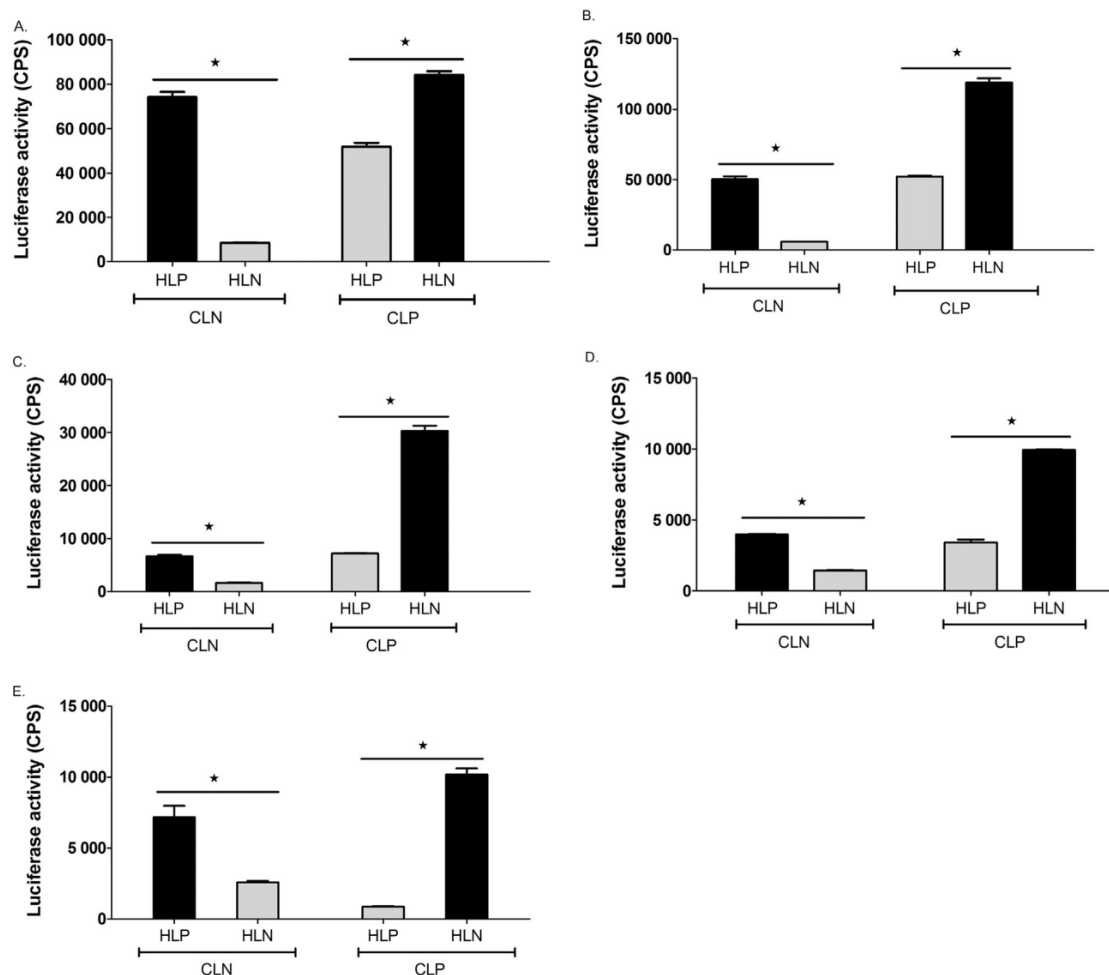


Fig. 7. mRNA transfection on HeLa, C2C12, MEF, or primary cells in NaCl 150 mM. HeLa cells (A), C2C12 cells (B), MEF cells (C), or rat aorta smooth muscle cells (D), and human fibroblasts (E), were transfected with 0.5 µg of mRNA, encoding luciferase, complexed in NaCl 150 mM with a lipid (CLN or CLP) associated with a helper lipid (HLN or HLP). Plates were incubated 24 h before cells lysis and luciferase activity measurement.

defects at the membrane level that allow for an improved flexibility of the cationic headgroups that in turn can lead to a better charge matching with DNA. The differences in DNA interactions are probably at the origin of the observations made in the cryoTEM and polyphosphates experiments, as the hybrid complexes **CLN:HLP** and **CLP:HLN** clearly appeared more adapted for improved DNA binding than homogeneous complexes **CLN:HLN** and **CLP:HLP**.

The structural differences between homogeneous and hybrid lipoplexes observed by cryoTEM in DMEM media indicated a crucial difference at the lipoplex surface. Indeed, the onion-like organization obtained with **CLN:HLN** and **CLP:HLP** homogeneous liposomes clearly showed an external corona with negatively charged DNA molecules. This is most likely detrimental for good interactions with cellular membranes that are composed of negatively charged molecules like proteins or proteoglycans. The structure itself of these assemblies thus appeared to be non-optimal for an efficient cellular entry. In addition, the DNA located in the external coating of the homogeneous assemblies is in direct contact with the surrounding environment and is therefore prone to degradation. As a result, a reduced number of DNA molecules may still be effective to enter the cells.

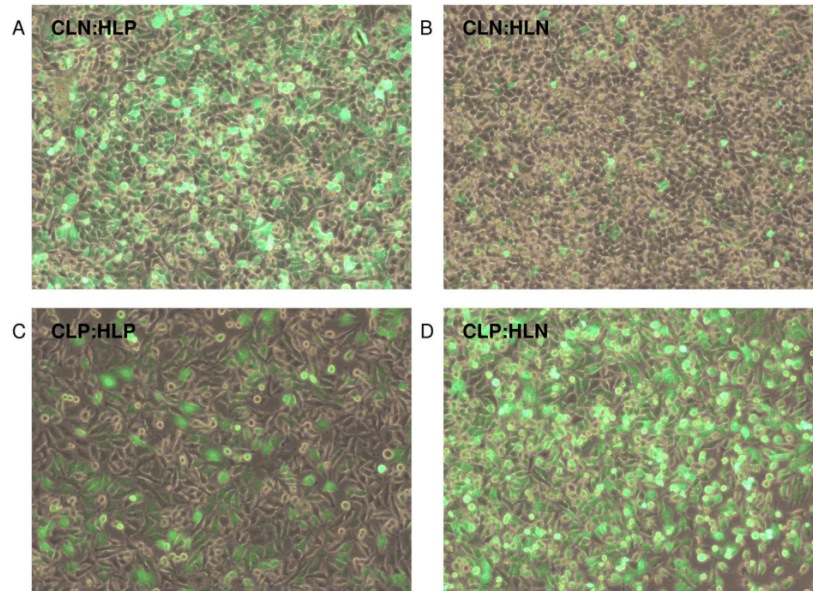
Opposite observations were made with hybrid systems, as all the DNA molecules were strongly bound to cationic liposomes and

entrapped inside the complexes. The external membrane layer of these complexes was therefore composed of cationic and helper lipids, which represent molecules well adapted to interact with the membrane components. It was therefore anticipated that the structure of hybrid liposomes was more suitable for cell internalization.

These observations were directly translated in the *in vitro* transfection experiments, as in all tested conditions hybrid liposomes provided significantly higher transfection than the homogeneous versions, independently of the nucleic acid type (DNA, mRNA and siRNA), the cell type (HeLa, C2C12, MEF, rat aorta muscle cells and human fibroblasts) or the encoded protein (luciferase and GFP).

In the case of DNA, on average both hybrid liposomes **CLN:HLP** and **CLP:HLN** displayed comparable transfection. For mRNA, the trend was in favor of **CLP:HLN** for a better transfection, indicating that this liposome may provide a spatial orientation more favorable for single stranded mRNA than **CLN:HLP**.

It is known that the structure of the cationic lipids or liposomes can have an impact in the different steps of the transfection process. In particular, our team previously demonstrated that the endosomal escape was highly dependent on the nature of the cationic lipids [14]. The mechanism of lipid-mixing relies on the interactions between the positively charged headgroups of the cationic lipids and the anionic



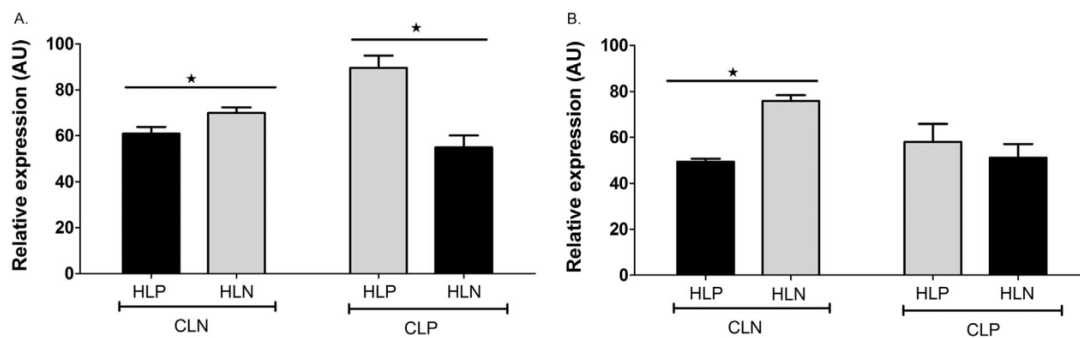
**Fig. 8.** eGFP mRNA transfection on HeLa cells. HeLa cells were transfected with 0.5  $\mu$ g of mRNA, encoding eGFP, complexed in NaCl 150 mM with a liposomes CLN:HLP (A), CLN:HLN (B), CLP:HLP (C) or CLP:HLN (D). Plates were incubated 24 h before cells observation.

phospholipids of the endosomal membrane [13,34]. Indeed these interactions lead to the formation of new neutral multilamellar lipidic structures causing the disruption of the endosomal membrane and the release of the nucleic acids in the cytosol. In our case, the different combinations **CLN:HLN**, **CLP:HLP**, **CLN:HLP** and **CLP:HLN** were all prepared from the same aminoglycoside paromomycin and therefore most likely induced a similar endosomal escape mechanism. Moreover, we have clearly demonstrated that the superiority of hybrid systems was observed for different types of nucleic acids having different “final destination” (cytosol for mRNA and siRNA, nucleus for DNA). The differences of transfection observed between homogenous and hybrid systems therefore probably do not arise from different behaviors in the intracellular compartment. Moreover, the cytotoxicity assay performed demonstrated similar cell viability for the 4 combinations tested, attesting that the improved transfection ability of hybrid liposomes was not related to a difference in toxicity.

We strongly believe that the cationic liposomes/nucleic acids interactions in the extracellular environment are the key aspects to consider. As it was demonstrated in the cryoTEM and the polyphosphates

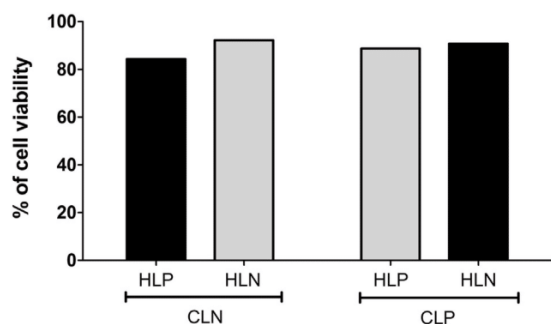
experiments, the hybrid supramolecular assemblies appeared to be well-suited for protecting the nucleic acid molecules through a strong binding to the cationic liposomes. The morphology of the hybrid liposomal membranes themselves allows for improved electrostatic interactions with DNA - and probably with mRNA and siRNA as well - that induces better internalization and thus better transfection. This was confirmed by GFP experiments, as we observed that the percentage of transfected cells is reduced with homogeneous liposomes compared to hybrid liposomes.

The well-known and widely used first generation Lipofectamine™ relies on such a hybrid system with a cationic lipid DOSPA (containing a N-based linker) and a helper lipid DOPE (P-based linker) [35]. Moreover, the efficacy of hybrid liposomes has recently reached an unprecedented point as lipoplexes consisting of DOTMA:DOPE formulated mRNA were recently assessed in a phase I clinical trial for the treatment of melanoma [36]. Intravenous administration of formulated mRNA was able to activate dendritic cells in various lymphoid tissues and therefore this strategy was seen as a potential technological platform for the treatment of various types of cancers. These two hybrid supramolecular



**Fig. 9.** Inhibition of LaminA/C expression. HeLa cells (A) or C2C12 cells (B) were transfected with 150 ng of LaminA/C iRNA, complexed with each liposomes in NaCl 150 mM. The gene expression levels of LaminA/C were measured by qPCR analysis, normalized against the expression levels of HPRT (housekeeping gene). The results are expressed as the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formula. Bars represent mean values  $\pm$  SEM for two independent experiments in duplicate.





**Fig. 10.** Percentage of HeLa cells survival. HeLa cells were transfected with 0.5  $\mu\text{g}$  of plasmid DNA, complexed with a cationic lipid (CLN or CLP) associated with a helper lipid (HLN or HLP). Plates were incubated 24 h before cytotoxicity measurement. Percentage of cells survival was determined using eBioscience® Annexin V staining protocol.

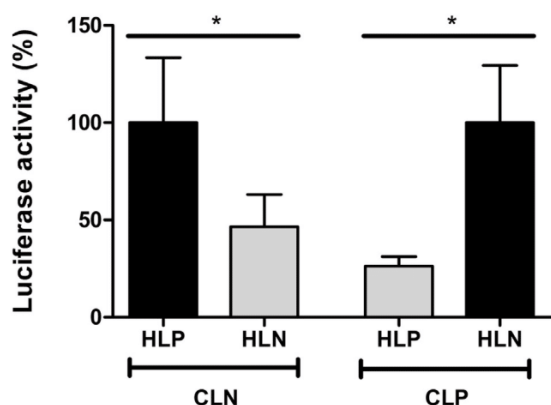
assemblies have been used for many years, but mismatching the linkers of the two molecules constituting the liposomes was probably not seen as a key point.

To conclude, our results suggest that the organization of the lipidic bilayer in the lipoplexes is crucial to provide efficient delivery of nucleic acids *in vitro* and *in vivo*, by influencing the binding strength between the nucleic acids and the delivery system. Here we shed the light on a new parameter of the lipidic bilayer at a supramolecular level, which is a criterion that now needs to be taken into consideration to obtain good interactions between the delivery vehicle and the nucleic acid to be transported in extracellular conditions, leading to improved transfection efficiency.

#### Aknowledgements

The authors are very grateful to Delphine Béziau, Virgine Forest, Stéphanie Lemarchand-Mindé and Martine Le Cunff for her technical assistance. This work was supported by special grants from the “Association Française contre les Myopathies” (Evry, France) and from BPIFrance financement (Paris, France) for Emerit and Hepavac. We are also indebted to P. Lehn and J.-M. Lehn for their pioneer works related to the synthesis of cationic lipids used in this study and for their stimulating discussions and constant interest in this work.

This work was realized in the context of the IHU-Cesti project which received French government financial support managed by the National



**Fig. 11.** In vivo transfection efficiency. Swiss mice were injected intramuscularly with 10  $\mu\text{g}$  of plasmid DNA, encoding luciferase, complexed with liposomes consisting of cationic lipids (CLN or CLP) combined with helper lipids (HLN or HLP). Luciferase expression was determined in crushed muscle 7 days after injection. Bars represent the mean of at least 6 individual muscles and the error bar the SEM.

Research Agency via the “Investment Into The Future” program ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Métropole and the Pays de la Loire Region. Laurence Dallet and Thibault Colombani are supported by funds from IHU-Cesti (Investissement d’Avenir ANR-10-IBHU-005, region Pays de la Loire et Nantes Métropole).

The author report that no competing financial interests or conflicts of interest exist.

#### References

- [1] M.A. Mintzer, E.E. Simanek, Nonviral vectors for gene delivery, *Chem. Rev.* 109 (2) (2009) 259–302.
- [2] H. Yin, R.L. Kanasty, A.A. Eltoukhy, A.J. Vegas, J.R. Dorkin, D.G. Anderson, Non-viral vectors for gene-based therapy, *Nat. Rev. Genet.* 15 (8) (2014) 541–555.
- [3] B. Draghici, M.A. Ilies, Synthetic nucleic acid delivery systems: present and perspectives, *J. Med. Chem.* 58 (10) (2015) 4091–4130.
- [4] D. Zhi, S. Zhang, S. Cui, Y. Zhao, Y. Wang, D. Zhao, The headgroup evolution of cationic lipids for Gene delivery, *Bioconjug. Chem.* 24 (4) (2013) 487–519.
- [5] D. Zhi, S. Zhang, B. Wang, Y. Zhao, B. Yang, S. Yu, Transfection efficiency of cationic lipids with different hydrophobic domains in gene delivery, *Bioconjug. Chem.* 21 (4) (2010) 563–577.
- [6] K.H. Bleicher, H.-J. Böhm, K. Müller, A.I. Alanine, Hit and lead generation: beyond high-throughput screening, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (5) (2003) 369–378.
- [7] G.M. Keseru, G.M. Makara, Hit discovery and hit-to-lead approaches, *Drug Discov. Today* 11 (15–16) (2006) 741–748.
- [8] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, M. Danielsen, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (21) (1987) 7413–7417.
- [9] N. Dan, D. Danino, Structure and kinetics of lipid–nucleic acid complexes, *Adv. Colloid Interf. Sci.* 205 (2014) 230–239.
- [10] I.A. Khalil, K. Kogure, H. Akita, H. Harashima, Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery, *Pharmacol. Rev.* 58 (1) (2006) 32–45.
- [11] J. Rejman, M. Conese, D. Hoekstra, Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis, *J. Liposome Res.* 16 (3) (2006) 237–247.
- [12] A.K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H.J. Haisma, Endosomal escape pathways for delivery of biologicals, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 151 (3) (2011) 220–228.
- [13] Y. Xu, F.C. Szoka, Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection, *Biochemistry (Mosc)* 35 (18) (1996) 5616–5623.
- [14] O. Le Bihan, R. Chèvre, S. Mornet, B. Garnier, B. Pitard, O. Lambert, Probing the *in vitro* mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale, *Nucleic Acids Res.* 39 (4) (2011) 1595–1609.
- [15] T. Constantinou-Kokotou, G. Karikas, G. Kokotos, Study of aminoglycoside–nucleic acid interactions by an HPLC method, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (8) (2001) 1015–1018.
- [16] D.P. Arya, R.L. Coffee, B. Willis, A.I. Abramovitch, Aminoglycoside–nucleic acid interactions: remarkable stabilization of DNA and RNA triple helices by neomycin, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (23) (2001) 5385–5395.
- [17] K. Rege, S. Hu, J.A. Moore, J.S. Dordick, S.M. Cramer, Chemoenzymatic synthesis and high-throughput screening of an aminoglycoside–polyamine library: identification of high-affinity displacers and DNA-binding ligands, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (39) (2004) 12306–12315.
- [18] K. Rege, A. Ladiwala, S. Hu, C.M. Breneman, J.S. Dordick, S.M. Cramer, Investigation of DNA-binding properties of an aminoglycoside–polyamine library using quantitative structure–activity relationship (QSAR) models, *J. Chem. Inf. Model.* 45 (6) (2005) 1854–1863.
- [19] M. Hendrix, E.S. Priestley, G.F. Joyce, C.H. Wong, Direct observation of aminoglycoside–RNA interactions by surface plasmon resonance, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (16) (1997) 3641–3648.
- [20] L. Frolov, A. Dix, Y. Tor, A.B. Tesler, Y. Chaikin, A. Vaskevich, I. Rubinstein, Direct observation of aminoglycoside–RNA binding by localized surface plasmon resonance spectroscopy, *Anal. Chem.* 85 (4) (2013) 2200–2207.
- [21] M. Sainlos, M. Hauchecorne, N. Oudrhiri, S. Zertal-Zidani, A. Aissaoui, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, P. Lehn, Kanamycin A-derived cationic lipids as vectors for gene transfection, *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 6 (6) (2005) 1023–1033.
- [22] M. Mével, M. Sainlos, B. Chatin, N. Oudrhiri, M. Hauchecorne, O. Lambert, J.-P. Vigneron, P. Lehn, B. Pitard, J.-M. Lehn, Paromomycin and neomycin B derived cationic lipids: synthesis and transfection studies, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 158 (3) (2012) 461–469.
- [23] L. Desigaux, M. Sainlos, O. Lambert, R. Chevre, E. Letrou-Bonneval, J.-P. Vigneron, P. Lehn, J.-M. Lehn, B. Pitard, Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (42) (2007) 16534–16539.
- [24] D. Habrant, P. Peuziat, T. Colombani, L. Dallet, J. Gehin, E. Goudeau, B. Evrard, O. Lambert, T. Haudebourg, B. Pitard, Design of ionizable lipids to overcome the limiting step of endosomal escape: application in the intracellular delivery of mRNA, DNA, and siRNA, *J. Med. Chem.* 59 (7) (2016) 3046–3062.
- [25] H. Farhood, N. Serbina, L. Huang, The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer, *Biochim. Biophys. Acta* 1235 (2) (1995) 289–295.

- [26] P. Midoux, C. Pichon, J.-J. Yaouanc, P.-A. Jaffrès, Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers, *Br. J. Pharmacol.* 157 (2) (2009) 166–178.
- [27] B. Pitard, Supramolecular assemblies of DNA delivery systems, *Somat. Cell Mol. Genet.* 27 (1–6) (2002) 5–15.
- [28] B. Pitard, O. Aguerre, M. Airiau, A.M. Lachagès, T. Boukhnikachvili, G. Byk, C. Dubertret, C. Herviou, D. Scherman, J.F. Mayaux, et al., Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (26) (1997) 14412–14417.
- [29] B. Pitard, N. Oudrhiri, J.P. Vigneron, M. Hauchecorne, O. Aguerre, R. Toury, M. Airiau, R. Ramasawmy, D. Scherman, J. Crouzet, et al., Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (6) (1999) 2621–2626.
- [30] M. Mével, T. Haudebourg, T. Colombani, P. Peuziat, L. Dallet, B. Chatin, O. Lambert, M. Berchel, T. Montier, P.-A. Jaffrès, et al., Important role of phosphoramido linkage in imidazole-based dioleoyl helper lipids for liposome stability and primary cell transfection, *J. Gene Med.* 18 (1–3) (2016) 3–15.
- [31] M. Mével, C. Neveu, C. Gonçalves, J.-J. Yaouanc, C. Pichon, P.-A. Jaffrès, P. Midoux, Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays, *Chem. Commun. (Camb)* 27 (2008) 3124–3126.
- [32] M. Mével, T. Montier, F. Lamarche, P. Delépine, T. Le Gall, J.-J. Yaouanc, P.-A. Jaffrès, D. Cartier, P. Lehn, J.-C. Clément, Dicationic lipophosphoramidates as DNA carriers, *Bioconjug. Chem.* 18 (5) (2007) 1604–1611.
- [33] S.S. Le Corre, M. Berchel, H. Couthon-Gourvès, J.-P. Haelters, P.-A. Jaffrès, Atherton-Todd reaction: mechanism, scope and applications, *Beilstein J. Org. Chem.* 10 (2014) 1166–1196.
- [34] I.M. Hafez, N. Maurer, P.R. Cullis, On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids, *Gene Ther.* 8 (15) (2001) 1188–1196.
- [35] B. Dalby, S. Cates, A. Harris, E.C. Ohki, M.L. Tilkins, P.J. Price, V.C. Ciccarone, Advanced transfection with lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications, *Methods* 33 (2) (2004) 95–103.
- [36] L.M. Kranz, M. Diken, H. Haas, S. Kreiter, C. Loquai, K.C. Reuter, M. Meng, D. Fritz, F. Vascotto, H. Hefesha, et al., Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy, *Nature* 534 (7607) (2016) 396–401.

## **Chapitre 2 : Formulation de lipides cationiques pour la délivrance intracellulaire de protéines**

## Chapitre 2 : Formulation de lipides cationiques pour la délivrance intracellulaire de protéines

Quelques études ont pu mettre en évidence l'utilisation des vecteurs lipidiques dans la délivrance intracellulaire de protéines (Sarker et al., 2014; Zelphati et al., 2001) mais leurs propriétés physico-chimiques restent inconnues. Cependant, comme pour les acides nucléiques, leurs efficacités résulteraient dans leurs propriétés physicochimiques. De plus, suite aux récentes découvertes sur les dérivés lipidiques d'aminoglycosides formulés avec des colipides neutres pour la délivrance d'acides nucléiques, nous nous sommes intéressés à évaluer la capacité de ses systèmes à délivrer des protéines.

Dans ce travail, nous avons cherché à étudier la capacité de nouvelles formules lipidiques à délivrer des protéines au sein de cellules vivantes. Nous avons mis au point un modèle d'étude basé sur une protéine modèle, la  $\beta$ -galactosidase, afin d'identifier parmi ces composés des vecteurs efficaces. Ensuite, un criblage de différentes formulations a été fait pour délivrer l'anticorps anti-cytokératine 8 couplé au fluorophore FITC (anti-K8).

Un dérivé d'aminoglycoside avec une tête paromomycine, **DOSP** (dioleyl succinyl paromomycin) a été formulé avec **MM27** (base imidazole). Nous avons évalué la capacité des lipides à vectoriser cette protéine dans différentes lignées cellulaires (cellules HeLa, cellules de carcinomes de poumons, myoblastes et cellules ovariennes). Les propriétés physico-chimiques des assemblages supramoléculaires les plus efficaces ont été explorées, par cryo-microscopie électronique à transmission, afin de mieux comprendre le mode d'action de ces vecteurs. Ensuite, nous avons étudié la capacité de ce vecteur à délivrer *in vitro* (cellules HeLa exprimant le CFTR sauvage ou muté) un anticorps (anti-K8) en mesurant son activité. Cet anticorps vise une cible fonctionnelle afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette technique dans la prise en charge de la mucoviscidose. Il a été démontré que la protéine cytokératine 8 (K8) était liée directement à la région mutée du canal CFTR (CFTR-F508del) provoquant sa rétention dans le réticulum endoplasmique et son absence à la membrane plasmique. En outre, il a été montré que l'inhibition de l'expression de K8 par des molécules pharmacologiques ou siARN dans des cellules HeLa exprimant le CFTR muté (CFTR-F508del) a conduit à la récupération de l'activité du canal (Colas et al., 2012; Davezac et al., 2004). Sur la base de cette découverte récente, nous avons émis

l'hypothèse que la délivrance d'anticorps anti-K8 dans les cellules HeLa exprimant CFTR-F508del perturberait l'interaction entre la protéine K8 et le CFTR muté menant à la correction du défaut de trafic du canal.

L'utilisation de la formulation **DOSP: MM27** a considérablement augmenté le nombre de cellules marquées par le fluorophore FITC (67% de la population totale transfectée). Cela conduit à un marquage intense du cytosquelette cellulaire visible après 4 et 24 heures d'incubation avec les complexes. En utilisant un anticorps secondaire AlexaFluor 546, les observations de microscopie confocale a révélé que l'anti-K8 délivré par **DOSP/MM27** est localisé principalement sur des structures fibreuses caractéristiques du motif du cytosquelette. L'anti-K8 semble colocaliser avec le signal AlexaFluor 546 résultant d'une immunocolocalisation de K8 fournissant une preuve de la fonctionnalité de l'anticorps délivré.

En cryo-TEM, **DOSP: MM27** n'est pas organisé en liposomes, mais dans des domaines de 20 nm. Lorsqu'ils sont mélangés avec l'anticorps anti-K8, **DOSP: MM27** forme des lipoplexes de 1 à 2 µm constitués d'éléments sphériques agrégés. A fort grossissement, ces agencements sphériques sont considérés comme des structures multilamellaires concentriques de 100-200 nm de diamètre avec des densités de protéines à leurs surfaces mais intérieurement dépourvues de protéines.

La conductance anionique dépendante de l'AMPc à travers la membrane plasmique est mesurée en utilisant une sonde sensible aux halogènes (l'iodure de 6-méthoxy-N-éthylquinolinium (MEQ)). Les cellules exprimant le CFTR sauvage (WT-CFTR) traitées ou non avec **DOSP: MM27/K8** présentent un fort taux de fluorescence suggérant l'activité du canal CFTR à la membrane plasmique. Les cellules exprimant CFTR-F508del transfectées avec **DOSP: MM27/K8** ont montré une augmentation rapide de la fluorescence MEQ. Ces résultats suggèrent la récupération de l'activité du CFTR à la membrane plasmique après traitement des cellules exprimant le CFTR mutée.

Conclusion : De ces résultats, il en résulte une formulation optimale permettant la délivrance intracellulaire de protéines. Deux formulations ont été mises en évidence. Une première formulation (**BGTC : DOPE**) permet de délivrer efficacement la protéine β-galactosidase alors que la seconde (**DOSP : MM27**) délivre l'anticorps anti-K8. Ces deux formulations ont été

caractérisées par cryo-microscopie électronique à transmission. Elles présentent des structures supramoléculaires différentes dépendant du type de liposomes et du ratio molaire. Ces résultats nous permettent de dire que l'efficacité de délivrance de protéines est liée à la structure des complexes et dépendant de la protéine, du type cellulaire et du milieu de formulation. La libération d'anticorps anti-K8 dans des cellules exprimant CFTR-F508del avec des liposomes résout la conductance anionique dépendante de l'AMPc. Ceci suggère la restauration partielle du trafic de canal CFTR-F508del vers la membrane plasmique. Cette approche fournirait un outil pour l'étude des canalopathies et le développement de futures stratégies thérapeutiques.

**L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de la publication suivante dans la revue *Molecular Therapy - Nucleic Acids*.**

# Liposome-based Formulation for Intracellular Delivery of Functional Proteins

Benoît Chatin<sup>1,2</sup>, Mathieu Mével<sup>1,2</sup>, Julie Devallière<sup>1,2</sup>, Laurence Dallet<sup>3</sup>, Thomas Haudebourg<sup>1,2</sup>,  
 Pauline Peuziat<sup>1,2</sup>, Thibault Colombani<sup>1,2</sup>, Mathieu Berchel<sup>4</sup>, Olivier Lambert<sup>3</sup>, Aleksander Edelman<sup>5</sup> and Bruno Pitard<sup>1,2,6</sup>

The intracellular delivery of biologically active protein represents an important emerging strategy for both fundamental and therapeutic applications. Here, we optimized *in vitro* delivery of two functional proteins, the  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) enzyme and the anti-cytokeratin8 (K8) antibody, using liposome-based formulation. The guanidinium-cholesterol cationic lipid bis (guanidinium)-tren-cholesterol (BGTC) (bis (guanidinium)-tren-cholesterol) combined to the colipid dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) (dioleoyl phosphatidylethanolamine) was shown to efficiently deliver the  $\beta$ -gal intracellularly without compromising its activity. The lipid/protein molar ratio, protein amount, and culture medium were demonstrated to be key parameters affecting delivery efficiency. The protein itself is an essential factor requiring selection of the appropriate cationic lipid as illustrated by low K8 binding activity of the anti-K8 antibody using guanidinium-based liposome. Optimization of various lipids led to the identification of the aminoglycoside lipid dioleoyl succinyl paromomycin (DOSP) associated with the imidazole-based helper lipid MM27 as a potent delivery system for K8 antibody, achieving delivery in 67% of HeLa cells. Cryo-transmission electron microscopy showed that the structure of supramolecular assemblies BGTC:DOPE/ $\beta$ -gal and DOSP:MM27/K8 were different depending on liposome types and lipid/protein molar ratio. Finally, we observed that K8 treatment with DOSP:MM27/K8 rescues the cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent chloride efflux in F508del-CFTR expressing cells, providing a new tool for the study of channelopathies.

*Molecular Therapy—Nucleic Acids* (2015) 4, e244; doi:10.1038/mtna.2015.17; published online 23 June 2015

**Subject Category:** Mechanisms of gene and nucleic acid transfer/transfection Vector trafficking and biodistribution

## Introduction

Protein-based therapeutics represents a major breakthrough in medicine with more than 100 proteins approved for clinical use. One recent development has been the use of recombinant proteins, including hormones like the insulin-like growth factor,<sup>1</sup> enzymes<sup>2</sup> and antibodies such as rituximab.<sup>3</sup> All these molecules have extracellular targets which emphasize one of the major current limitations of this therapy namely the lack of an efficient way to deliver functional polypeptides into the cell. Numerous proteins need to be transported intracellularly to exert their therapeutic action but do not spontaneously cross plasma membranes due to their important size and biochemical properties. New methods to deliver functionally active proteins into the cells would extend use of therapeutic proteins to attractive intracellular targets and would be a powerful tool for laboratory investigation. Furthermore, protein delivery could overcome some drawbacks of gene therapy, in particular the difficulty of controlling expression levels and the oncogenic risk associated with transgene integration into the host cell genome. For treatments of cancers, infectious diseases or generation of induced pluripotent stem cell, that require only a transient expression of the transgene, delivery of protein represents a promising and safe approach.

In this context, various strategies are currently available for intracellular delivery. Microinjection allows the efficient transduction of a controlled amount of protein directly into the cell cytoplasm, but can only be applied to a small

number of cells. Electroporation also allows the transport of therapeutic molecules. Electric pulse delivery created permeabilized areas in the cell membrane but has associated undesirable characteristics like damaging effects to the membrane affecting viability and poor cell targeting. Recently, new methods involving engineering of the protein to be delivered have been developed. However, this technology requires its fusion with a particular class of peptides named protein transduction domains (PTDs) or cell penetrating peptides (CPPs)<sup>4,5</sup> which can interfere with protein folding, leading to a loss of biological function. Another attractive nonviral gene transfer approach is based on lipid encapsulation. Cationic lipids have shown to be efficient vehicle for transmembrane delivery of nucleic acids such as DNA or siRNAs and have more recently been used to transfer proteins.<sup>6–8</sup> Lipid-based delivery system does not require protein engineering step, the procedure is simplified and the amount of protein required reduced. Over the past few decades, liposomes have evolved from being inert drug carriers to highly responsive delivery system, with active targeting, increased stealth, and controlled drug-release properties.<sup>9</sup> These amphiphilic compounds spontaneously associate with oligonucleotides forming supramolecular assemblies taken up by cells. The mechanism of action is well established, having been studied extensively for gene transfer process.<sup>10</sup> The positively charged macromolecule/lipid complex interacts with the negatively charged cell plasma membrane, leading to its internalization through endocytosis. Once in the

<sup>1</sup>Unité INSERM UMR 1087, CNRS UMR 6291, Nantes, France; <sup>2</sup>Université de Nantes, L'Institut du Thorax, Nantes, France; <sup>3</sup>CBMN UMR-CNRS 5248, Université de Bordeaux IPB, Pessac, France; <sup>4</sup>UMR CNRS 6521, IFR 148 ScInBioS, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, Brest, France; <sup>5</sup>Faculté de médecine Paris-Descartes, INSERM U845, Paris, France; <sup>6</sup>Present address: InCellArt, Nantes, France. Correspondence: Bruno Pitard, InCellArt 21 rue La Noue-Bras-de-Fer 44200 Nantes – France. E-mail: [bruno.pitard@univ-nantes.fr](mailto:bruno.pitard@univ-nantes.fr)

**Keywords:** antibody delivery; ionizable lipids; intracellular delivery; supramolecular assembly

Received 13 November 2014; accepted 17 April 2015; published online 23 June 2015. doi:10.1038/mtna.2015.17



endocytic pathway, the cargo molecule avoids lysosomal degradation and reaches cytosol by destabilization of the endosomal membrane structure.<sup>11</sup> The ability of liposomes to cross plasma membranes and deliver their cargoes into the cytoplasm greatly depends on their physico-chemical properties. Although the properties of lipoplexes are well known,<sup>12</sup> protein-based complexes are still ill defined. Thus, there is a need to develop and characterize efficient and safe synthetic intracellular protein delivery systems.

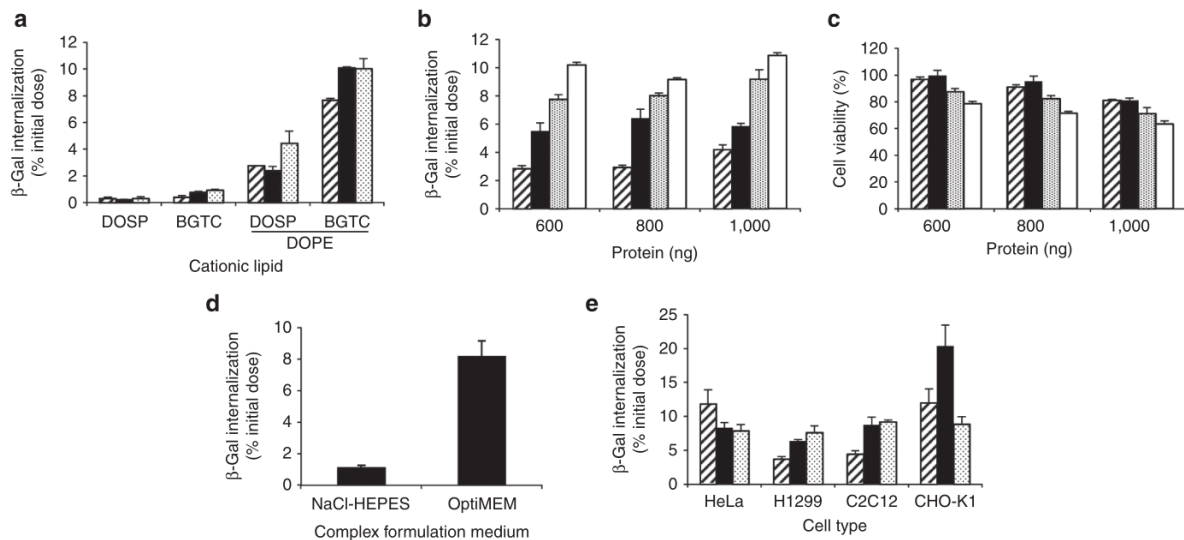
In the present study, we have identified cationic lipid formulations able to deliver into cells two types of proteins, enzyme and antibody. The guanidinium-cholesterol cationic lipid bis (guanidinium)-tren-cholesterol (BGTC) was combined to the colipid dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) to efficiently transport the  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) enzyme intracellularly. Transfection parameters (lipid/protein molar ratio, cytotoxicity, and culture medium) were optimized and  $\beta$ -gal activity quantified confirming that protein structure and function were not modified as a result of complexation. The aminoglycoside lipid dioleoyl succinyl paromomycin (DOSP) associated with the imidazole-based helper lipid MM27 was shown to achieve intracellular delivery of biologically active anti-cytokeratin 8 (K8) antibody. The relationship between the physicochemical properties of these two supra-molecular assemblies and their transfection efficiency were investigated by cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM). Finally, we evaluated the liposome DOSP:MM27 as

a potential delivery system of the K8 therapeutic antibody for cystic fibrosis (CF). CF is a frequent and lethal disease, caused by mutation in the gene encoding the chloride channel cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). More than 1,900 mutations of the *CFTR* gene have been described, although the deletion of the phenylalanine residue at position 508 (F508del) is the most abundant in CF patients, with an occurrence of approximately 70%. F508del causes retention of the mutated-CFTR in the endoplasmic reticulum preventing the correct localization of CFTR channels at the plasma membrane.<sup>13,14</sup> It was shown that K8 protein interacts with F508del-CFTR and is implicated in its retention in endoplasmic reticulum.<sup>15</sup> Thus, we tested whether delivering K8 antibody to F508del-CFTR expressing HeLa cells would destabilize F508del-CFTR and K8 interaction leading to the functional plasma membrane expression of F508del-CFTR.

**Results**

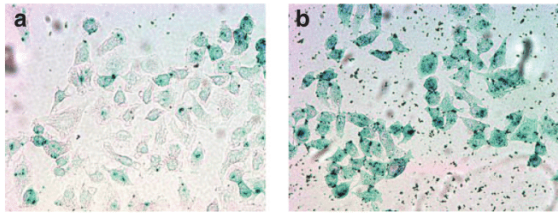
**Optimization of the lipid/protein formulation for  $\beta$ -galactosidase delivery**

Based on the screening of a cationic lipid library, we identified two compounds able to deliver  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) in cultured HeLa cells. **Figure 1a** shows that the fatty acid derivative DOSP, and the cholesterol derivative BGTC, complexed with  $\beta$ -gal at various cationic lipid/protein molar ratios (MR),



**Figure 1** Intracellular delivery of the reporter protein  $\beta$ -gal complexed with various lipid formulations. (a) Internalization of  $\beta$ -gal complexed with micelles composed of bis (guanidinium)-tren-cholesterol (BGTC) and liposomes formed of BGTC:DOPE or DOSP:DOPE in HeLa cells.  $\beta$ -gal protein (800 ng) was formulated with cationic lipids in OptiMEM at various lipid/protein molar ratio (MR): 1000 (dashed bars), 1,500 (black bars), or 2,000 (dotted bars). Complexes were added on cells for 8 hours before cells lysis and  $\beta$ -gal activity measurement. Results are expressed as percentage of the initial dose of protein used to form complexes. (b,c) Effect of protein amount and MR on internalization efficiency and cytotoxicity in HeLa cells.  $\beta$ -gal protein (600, 800, 1,000 ng) was formulated with BGTC:DOPE in OptiMEM at various MR: 1,000 (dashed bars), 1,500 (black bars), 2,000 (dotted bars), or 2,500 (white bars). Percentage of internalization and cell viability were assessed by  $\beta$ -gal activity measurement and MTT assay respectively. (d) Effect of the formulation medium on transfection efficiencies. Percentage of  $\beta$ -gal internalization was evaluated by delivering 800 ng of protein formulated with BGTC:DOPE at a MR of 2,000 in NaCl-HEPES or OptiMEM medium. (e) Internalization of  $\beta$ -gal complexed with BGTC:DOPE in various cell types.  $\beta$ -gal protein (800 ng) was formulated with liposomes in OptiMEM at various lipid/protein molar ratio (MR): 1,000 (dashed bars), 1,500 (black bars), or 2,000 (dotted bars) and incubated with HeLa, H1299, C2C12, or CHO-K1 cells. Results are expressed as the mean percentage of three representative experiments  $\pm$  SD.





**Figure 2**  $\beta$ -gal internalization over time in HeLa cells.  $\beta$ -gal protein (800 ng) was complexed with bis (guanidinium)-tren-cholesterol (BGTC):DOPE at a MR of 1,500. Complexes were added onto cells in serum-free DMEM for 15 minutes (a) or 4 hours (b). Cells were subsequently washed, fixed and stained with X-gal.

led to  $\beta$ -gal internalization into cells. These cationic lipids used alone as micelles showed a limited efficacy, but combined with the neutral lipid DOPE to form liposomes, dramatically increased the internalization efficiency ( $0.3 \pm 0.1\%$  for DOSP versus  $4.44 \pm 0.8\%$  for DOSP:DOPE and  $0.94 \pm 0.05\%$  for BGTC versus  $10.1 \pm 0.6\%$  for BGTC:DOPE of  $\beta$ -gal intracellular delivery, MR 2,000). Spontaneous internalization of  $\beta$ -gal was not seen in these conditions. We further optimized the efficiency of the delivery by exploring the properties of the BGTC:DOPE formulation. The effect of increased amount of protein on internalization efficiency was assessed in parallel with cytotoxic effect. **Figure 1b** shows that the percentage of protein internalized into cells increased with the lipid/protein MR reaching  $\sim 10\%$  of the protein initial dose, whereas no significant increase was achieved using growing amount of  $\beta$ -gal (600–1,000 ng) at a fixed MR. We observed that the optimal protein delivery was achieved with 1,000 ng of  $\beta$ -gal complexed with BGTC:DOPE using a MR of 2,500, which led to a 40% reduction in cell viability (**Figure 1c**). To avoid extensive cell death, we chose to work with 800 ng of protein complexed with BGTC:DOPE at a MR of 1,500 leading to the delivery of 6% of the protein into the cells without compromising their viability. We next investigated the impact of the formulation medium of BGTC:DOPE/ $\beta$ -gal complexes on protein delivery process. The amount of internalized  $\beta$ -gal showed a sevenfold increase in uptake of complexes formulated in OptiMEM compared to NaCl-HEPES buffer ( $8.2 \pm 1.2\%$  for OptiMEM versus  $1.14 \pm 0.2\%$  for NaCl-HEPES of  $\beta$ -gal internalization, **Figure 1d**). Finally, the ability of BGTC:DOPE to deliver proteins into various cell lines was assessed. **Figure 1e** shows that BGTC:DOPE triggered  $\beta$ -gal internalization in lung carcinoma cells (H1299) myoblasts (C2C12) and ovary cells (CHO-K1), with similar effectiveness than in HeLa cells.

To investigate the localization of  $\beta$ -gal after intracellular internalization and validate that internalized protein is functional, HeLa cells were incubated with BGTC:DOPE/ $\beta$ -gal complexes and an X-gal staining was performed on cells after 15 minutes or 4 hours. Results showed that for short incubation time (15 minutes), the  $\beta$ -gal activity was low as illustrated by the faint blue color in cell cytosol (**Figure 2a**). In contrast, after 4 hours, the cells exhibited a dense blue color within the cytoplasm highlighting an enhanced  $\beta$ -gal activity corresponding to an increase of functional enzyme within the cytoplasm after probably its release from endosome (**Figure 2b**).

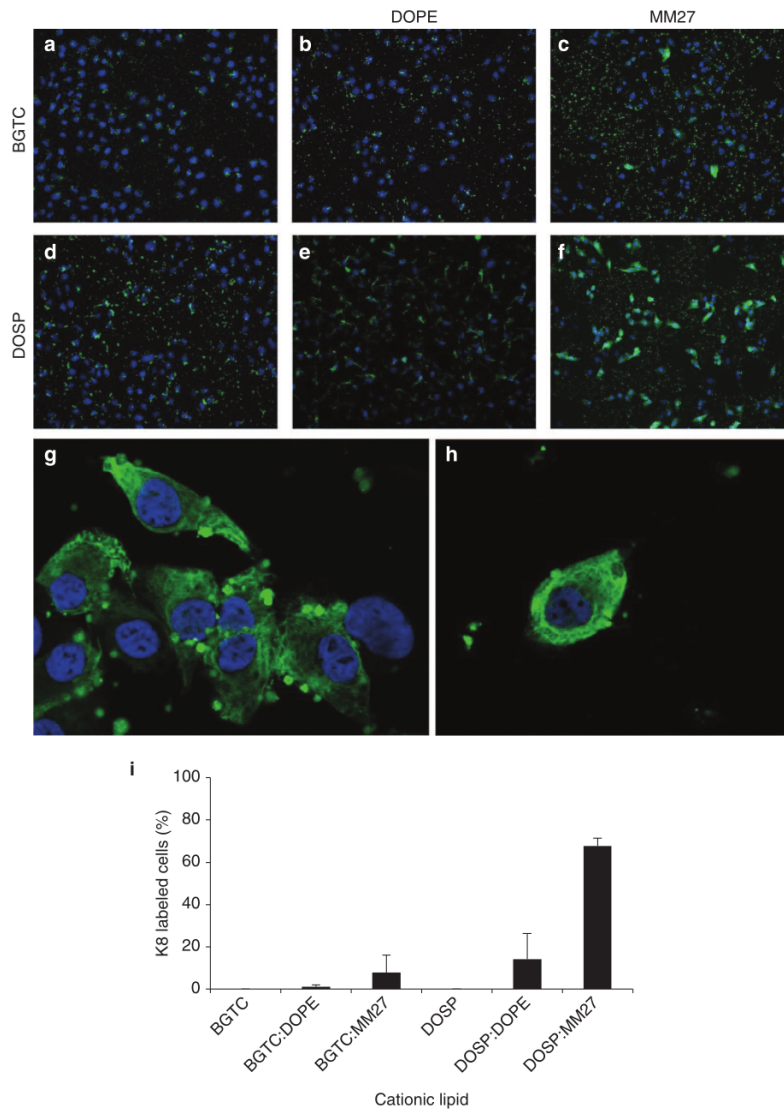
### Optimization of the lipid/protein formulation for K8 antibody delivery

In recent years, therapeutic antibodies have been shown to be of great importance for clinical use. Expanding their application to intracellular targets is an emerging concept that would have many applications mainly by modulating intracellular protein-protein interactions. With this aim, we tested the ability of cationic lipids to deliver an antibody in its native conformation, thus capable of recognizing its antigenic intracellular target. An fluorescein isothiocyanate (FITC)-tagged monoclonal immunoglobulin directed against human cytokeratin 8 (FITC-K8) was delivered into HeLa cells using BGTC and DOSP associated or not with the colipid DOPE (**Figure 3a,b,d,e**). After 4 hours of incubation, only few cells displayed cytoplasmic fluorescence and K8 antibody was mostly detected in complexes surrounding the cells. This prompted us to test whether a different neutral colipid could improve the antibodies delivery. The formulation of BGTC as liposomes with the imidazole-based helper lipid named MM27, did not lead to a significant change in the percentage of positive cells (**Figure 3c**). However, the use of the DOSP:MM27 formulation dramatically increased the number of FITC-labeled cells (**Figure 3f,g,h**). The percentage of K8-labeled cells was quantified and revealed that 67% of the total population was transfected using the DOSP:MM27 formulation compared to 14 and 8% with DOSP:DOPE and BGTC:MM27 respectively (**Figure 3i**).

DOSP:MM27-mediated anti-K8 antibody delivery led to an intense labeling of the cell cytoskeleton, visible after 4 and 24 hours (**Figure 4a,b**) of incubation with the complexes, demonstrating the ability of DOSP:MM27 liposomes to deliver the antibody over an extended period of time. Although fixation can produce artifacts, the cytoskeletal staining pattern observed in PFA-fixed HeLa cells treated with DOSP:MM27/FITC-K8 liposomes (**Figure 4c**) was comparable with the staining seen in living cells after transfection (**Figure 4a,b**). In order to confirm the capacity of the liposome to achieve intracellular delivery of biologically active FITC-K8 antibody, cells transfected with DOSP:MM27/FITC-K8 were fixed, permeabilized, and then incubated with a rabbit polyclonal anti-K8 antibody, followed by immunostaining with a secondary anti-rabbit AlexaFluor 546. FITC-K8 and K8 antibodies recognize different epitopes on the same K8 target, respectively the C-terminus and the N-terminus around the serine at position 73. Confocal microscopy observation (**Figure 4d**) revealed that FITC-K8 delivered by liposome localized mainly on fiber structures characteristic of cytoskeletal staining pattern. In addition, FITC-K8 appeared to colocalize with the AlexaFluor 546 signal resulting from K8 immunostaining providing evidence of the functionality of the delivered antibody (**Figure 4e,f**).

### Physicochemical characterization of BGTC:DOPE/ $\beta$ -gal and DOSP:MM27/K8 complexes

Next, we investigated the physicochemical properties of the complexes obtained by mixing  $\beta$ -gal or K8 antibody with BGTC:DOPE or DOSP:MM27 liposomes respectively. Migration of BGTC:DOPE/ $\beta$ -gal assemblies was performed on a native polyacrylamide gel electrophoresis to precisely quantify protein complexation by the cationic molecules.



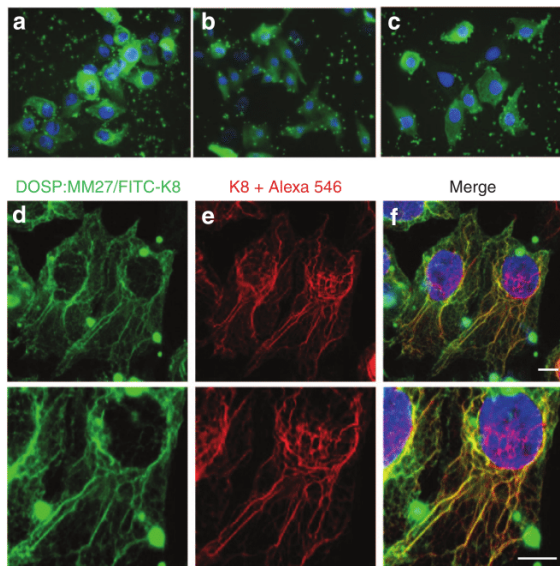
**Figure 3 Intracellular delivery of the FITC-K8 antibody complexed with various lipid formulations.** HeLa cells were treated with FITC-K8 (800 ng) formulated with bis (guanidinium)-tren-cholesterol (BGTC) (a), BGTC:DOPE (b), BGTC:MM27 (c), DOSP (d), DOSP:DOPE (e), or DOSP:MM27 (f) (g) and (h), at a molar ratio of 1,500. In each condition, cells were incubated for 4 hours with the lipid/FITC-K8 complexes before fixation and mounting with ProLong antifade DAPI reagent. (i) Quantification of K8-positive cells after transfection with BGTC, BGTC:DOPE, BGTC:MM27, DOSP, DOSP:DOPE, and DOSP:MM27. Results are expressed as the mean percentage of three representative experiments  $\pm$  SD.

Figure 5a shows that the amount of uncomplexed  $\beta$ -gal, free protein migrating through the gel, decreased rapidly as the MR raised with a consequent amount of  $\beta$ -gal complexed with BGTC:DOPE at a molar ratio of 100. Lipid/protein MR above 200 resulted in aggregates that did not migrate out of the well showing that BGTC:DOPE liposome allowed the efficient complexation of the protein and its compaction into stable complexes at high MR. Protein complexation was also evaluated for FITC-K8 antibody and DOSP:MM27. Fluorescent analysis was used to determine the amount of residual free antibody present in supernatant after DOSP:MM27/FITC-K8

formulation depending on lipid/protein MR. Figure 5b shows that around 40% of FITC-K8 was associated with DOSP:MM27 at a MR of 100. Elevating the MR increased the percentage of FITC-K8 complexation with 100% FITC-K8 associated with DOSP:MM27 from a MR of 400.

To further elucidate the mechanism of action of liposomes, various lipid mixture conditions were analyzed by cryoTEM. Figure 6 shows the morphology and assembly of the supra-molecular complexes of BGTC:DOPE/ $\beta$ -gal using different MR. At high MR of 1,500, liposomes were generally spherical unilamellar vesicles forming large aggregates (Figure 6a–c).

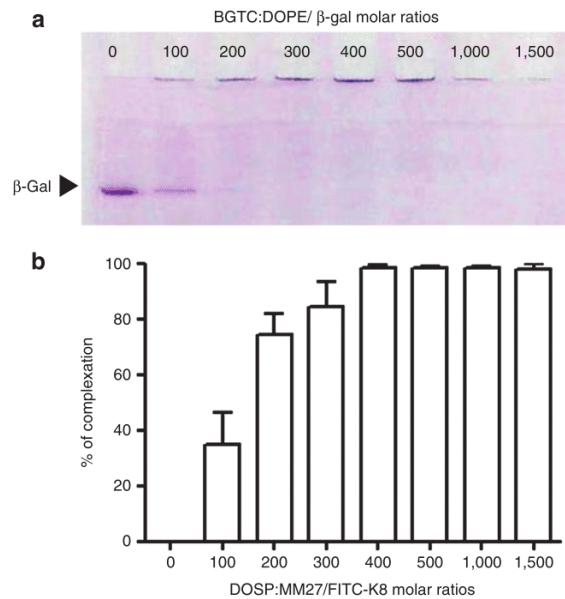




**Figure 4** Intracellular localization of FITC-K8 antibody delivered by DOSP:MM27 liposome. HeLa cells were plated on 24-well plate and incubated with DOSP:MM27/FITC-K8 complexes for 4 hours (a) or 24 hours (b) and observed under microscope without further treatment. HeLa cells were plated on 24-well plate, incubated with DOSP:MM27/FITC-K8 complexes for 4 hours and fixed with PFA before microscope observation (c). HeLa cells were plated on glass coverslips, incubated with DOSP:MM27/FITC-K8 complexes for 4 hours, fixed and immunostained with a rabbit anti-K8 and a secondary anti-rabbit AlexaFluor® 546 (red). Nuclei stained using DAPI (blue), FITC-K8 (green) (d) and K8 staining (red) (e) are visualized under confocal fluorescence microscope as superimposition of images (merge) (f). Lower panel shows higher magnification. Scale bar = 10 µm.

The β-gal protein appeared to be entrapped within aggregates, occasionally forming protein layers/junctions between two lipid membranes (black arrows). At a MR of 750 (Figure 6d–f), protein junctions were more frequently encountered suggesting a higher amount of protein bound to liposome surfaces. The particles displayed more polymorphic structures: spherical vesicles coexist with vesicles of irregular shape as well as multiwalled and fused vesicles. At a MR of 375 (Figure 6g–i), liposomes formed larger isolated multilamellar objects decorated with proteins on their external surfaces (white arrows).

In order to explain the significant difference in the K8 delivery efficiency between formulations, we next investigated by cryoTEM the structure of complexes formed with K8 and various liposome preparations. BGTC:DOPE and BGTC:MM27 lipid mixtures formed unilamellar liposomes. In the presence of K8 antibody, both mixtures formed micron-size aggregates due to protein–lipid interaction (Figure 7a,b). For BGTC:DOPE, protein densities were visible at liposome surface as well as between lipid membranes without forming regular organization (white arrows, Figure 7a). DOSP:DOPE mixture produced liposomes, heterogeneous in size and lamellar organization. In contact with anti-K8, liposome aggregation was observed, indicative of a strong protein–lipid interaction (Figure 7c). However, it remained difficult to provide structural details on lipid/protein interaction due to liposome heterogeneity. Unlike others,



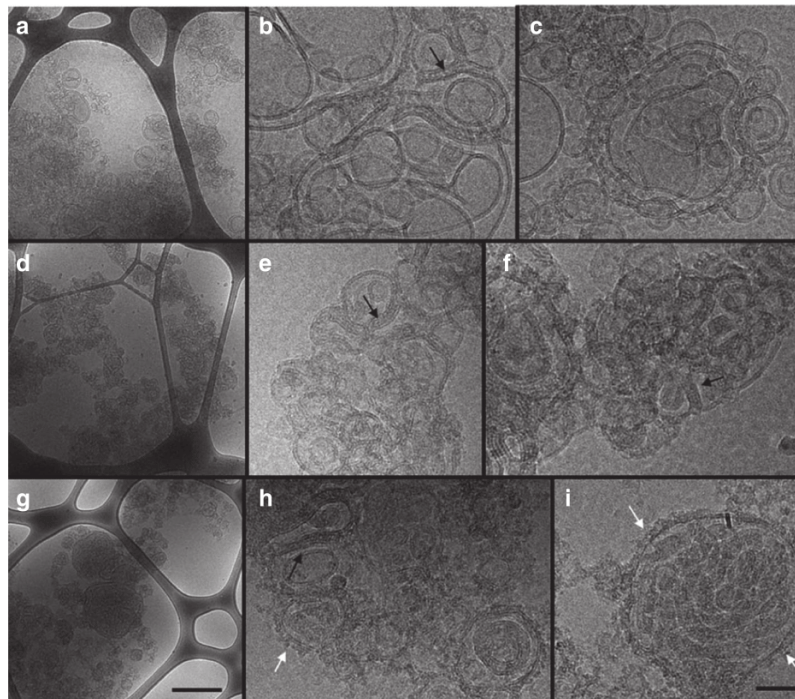
**Figure 5** Complexation of the β-gal anti-FITC-K8 protein with the BGTC:DOPE or DOSP:MM27 lipids depending on molar ratios. Lipid-proteins complexes were formed in OptiMEM at various molar ratios (100–1,500) and nonassociated proteins were visualized on a native-PAGE gel for the β-gal (a) or measured by fluorospectrometer for the FITC-K8 (b).

DOSP:MM27 mixture was not organized in liposome but in 20 nm domains showing no evidence of internal structure. When mixed with anti-K8 antibody, DOSP:MM27 formed 1–2 µm lipoplexes consisting of aggregated spherical elements (Figure 7d). At higher magnification, these spherical arrangements were seen as “onion-like” concentric multilamellar structures of 100–200 nm diameter exposing protein densities at their surfaces (white arrows Figure 7d) but internally devoid of proteins.

**Functional impact of anti-K8 antibody delivery on F508del-CFTR trafficking**

We finally tested the ability of the DOSP:MM27/K8 complexes to restore the F508del-CFTR trafficking in mutated HeLa cells. It was demonstrated that K8 was bound directly to the F508del *in vivo* causing retention of the mutated F508del-CFTR channel in the endoplasmic reticulum and its absence in the plasma membrane.<sup>16</sup> Furthermore, it was shown that inhibition of K8 expression by pharmacological molecules or siRNA in F508del-expressing HeLa cells led to the recovery of CFTR-dependent iodide efflux.<sup>15,16</sup> On the basis of this recent discovery, we hypothesized that delivering K8 antibody to F508del-CFTR expressing HeLa cells would disrupt F508del-CFTR and K8 interaction leading to the correction of the F508del-CFTR trafficking defect. It is known that the interaction between F508del-CFTR and K8 occurs through the N-terminal of the K8 protein. In order to ensure that the observed effect is specific, we used an antiK8 recognizing the C-terminus of the K8 target as an irrelevant antibody control.

The recovery of F508del-CFTR processing was monitored by measuring the cAMP-dependent anionic conductance



**Figure 6** CryoTEM images of  $\beta$ -gal complexed with BGTC:DOPE liposomes formulated at various cationic lipid/protein ratios. (a–c) MR = 1,500; (d–f) MR = 750; (g–i) MR = 375. Black arrows denote  $\beta$ -gal protein accumulation forming junctions between lipid membranes. White arrows denote protein densities coated at the surface of liposomes. Scale bars, 0.5  $\mu$ m (a,d,g) and 50 nm (b,c,e,f,h,i).

through the plasma membrane of F508del-CFTR expressing cells using halide-sensitive probe, 6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide (MEQ) (Figure 8). Upon addition of cAMP to initiate channel opening and exchange of extracellular  $I^-$  for nitrate  $NO_3^-$ , MEQ fluorescence increased in WT-CFTR expressing cells (triangles) as CFTR-mediated anion transport results in replacement of intracellular  $I^-$  with nonquenching  $NO_3^-$ . Under iodide perfusion, fluorescence of intracellular MEQ was rapidly quenched by entry and collision with iodide ions. WT-CFTR expressing cells treated or not with DOSP:MM27/K8 displayed a similar behavior but a reduced fluorescence amplitude was detected in nontreated cells. In contrast, F508del-CFTR expressing cells, untreated (cross) or treated with DOSP:MM27/antiK8 C-ter (circle), showed a weak response with a low anionic conductance illustrated by the attenuated fluorescence changes. Finally, F508del-CFTR expressing cells transfected with DOSP:MM27/antiK8 N-ter (diamonds) displayed a robust and prompt increase in MEQ fluorescence under cAMP stimulation, followed by a rapid quenching after iodide perfusion. Altogether, these results indicate that delivering K8 antibody into F508del-CFTR expressing cells using liposomes rescues cAMP-dependent anionic conductance, suggesting a partial restoration of F508del-CFTR channel trafficking towards the plasma membrane.

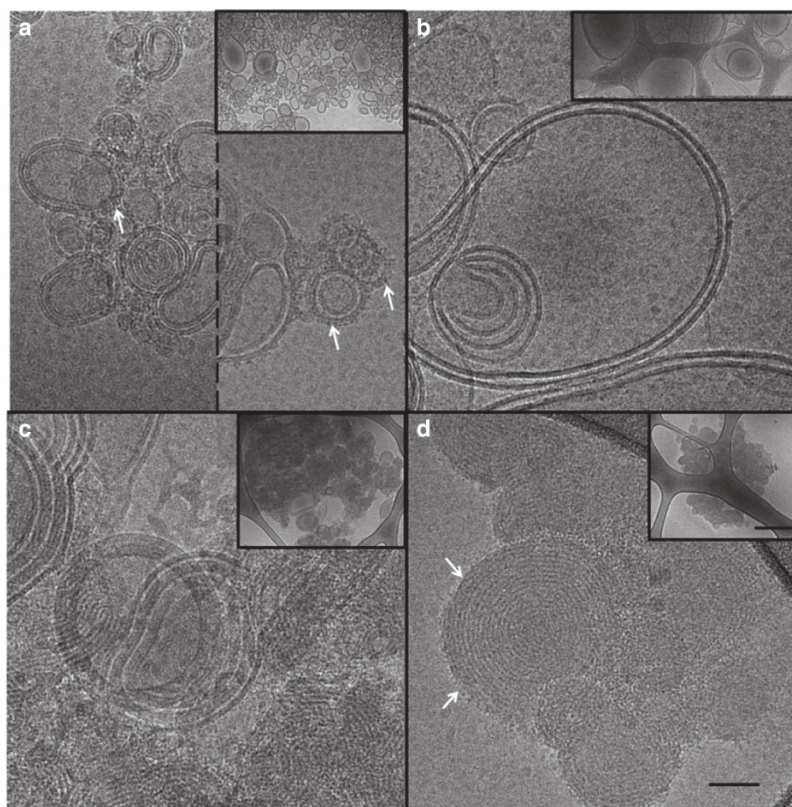
### Discussion

In this study, we demonstrate rapid and efficient delivery of catalytic protein and antibodies into the cytosol of cultures

cells using liposome-based formulation. Intracellular delivery of functional proteins provides a potential tool to replace missing, dysfunctional and poorly expressed proteins or antagonize key intracellular pathways. Protein-based therapeutics is a promising approach for several biomedical applications including stem cell engineering, imaging, and signaling studies.

Delivery of  $\beta$ -gal was chosen as a test of the efficacy of lipid formulations since this multimeric enzyme is susceptible to inactivation during the delivery process. The availability of a highly sensitive detection test, and the possibility to observe its presence in the cell cytoplasm by X-gal staining, allowed us to perform a screening of cationic lipids library. Furthermore, as detection is based on enzymatic activity, this is a stringent way to ascertain that analyzed compounds deliver proteins that retain, at least partially, their active conformation. Although most of the cationic lipids tested proved to be inefficient to deliver the enzyme into cultured HeLa cells, two molecules, DOSP and BGTC, were able to transport a low but detectable amount of the initial protein dose into the cells when used as micellar solutions. BGTC is a cholesterol-based lipid bearing two guanidinium polar head-groups<sup>17</sup> and DOSP is a fatty-acid-based molecule bearing a paromomycin head-group.<sup>18,19</sup> These two compounds are commonly used for their high DNA and siRNA transfection potentials and their lack of toxicity. In order to enhance their protein delivery activities, we formulated them as liposomal suspensions combined with the neutral lipid, DOPE. We observed a dramatic increase in the activity for DOSP:DOPE and BGTC:DOPE without noticeable toxicity. DOPE is commonly





**Figure 7** CryoTEM images of cationic lipid/K8 antibody complexes. (a) BGTC:DOPE, (b) BGTC:MM27, (c) DOSP:DOPE, (d) DOSP:MM27. White arrows denote protein densities visible at liposome surfaces and between lipid membranes. Insets correspond to a larger view of each condition. Scale bars 50 nm (inset 500 nm).

used in nucleic acid transfection reagents to promote endosomal membrane disruption.<sup>12,20</sup> It is likely that cationic lipids used alone led to the cellular internalization of the protein, followed by lysosomal degradation. Adding DOPE to the formulation would promote the delivery of the enzyme to the cytosol before fusion of endosomes with lysosomes. It is to be noted that cells were lysed with reporter lysis buffer directly into culture plates following transfection. We assume that the amount of internalized  $\beta$ -gal may be slightly overestimated by quantifying external liposomes that bind cell membrane. Nevertheless, extensive phosphate-buffered saline (PBS) washing removed most of the complexes and microscopy analysis confirmed the delivery of the  $\beta$ -gal into the cytosol. X-gal staining of cells treated with BGTC:DOPE/ $\beta$ -gal lipoplexes showed detectable staining throughout the cytosol of all treated cells, confirming catalytic activity of the enzyme. Interestingly,  $\beta$ -gal activity was still detectable after 24 hours of incubation, indicating a prolonged release of the enzyme into the cells and/or a prolonged protein half-life in the cytosol.

We then investigated whether liposomes could deliver not only enzymes but proteins with binding activities such functional antibodies into HeLa cells. An FITC-tagged antibody directed against human cytokeratin 8 was formulated with BGTC and DOSP, in the presence or absence of DOPE. None of the conditions tested by varying the protein dose and the

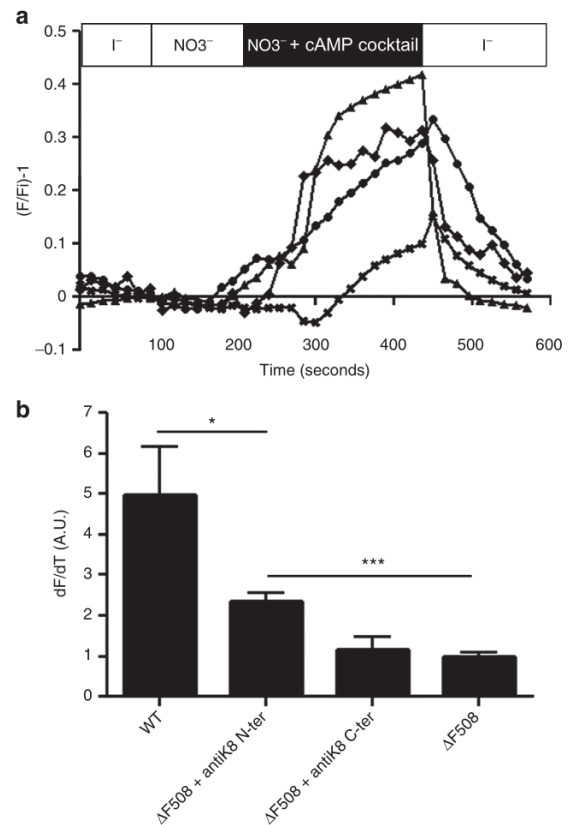
molar ratio, enabled entry of the antibody into the cells. Microscopy observation showed confined FITC fluorescence staining area suggesting that lipoplexes were trapped in the endosomal system. Lack of efficiency for cationic lipid-mediated antibody delivery has already been observed in previous studies. It was described that antibodies delivered by Saint-2:DOPE were localized in the cell but formed confined staining area, independent of their targets, probably indicating endosomal sequestration of Saint2:DOPE/antibodies.<sup>8</sup> Addressing this issue, we chose to enhance the endosomal escape step by using MM27, an imidazole-bearing neutral lipid. It has been reported previously that this compound is 100-fold more efficient than DOPE in promoting DNA transfection.<sup>21,22</sup> It was shown that the amines of the imidazole head-group, neutral at physiological pH, undergo protonation in acidic organelles, leading to endosomal membrane disruption by a proton-sponge mechanism.<sup>23</sup> We demonstrated that FITC-K8 delivered by DOSP:MM27 localized mainly on fiber cytokeratin network for at least 24 hours, confirming the functionality of the antibody. Moreover, we observed that 70% of treated cells were labeled after 4 hours, showing a dramatic improvement compared with DOSP and DOSP:DOPE-mediated delivery. Altogether, these findings indicate that the efficiency of the delivery system varies greatly depending on the protein type, and that vectors have to be adapted and optimized according to the cargo. This

contrasts with DNA or RNA delivery which takes advantage of the universal structure of nucleic acids. Indeed, nucleic acids, independently of the nucleotide sequence, present the same structure and electrical charge, unlike peptides and proteins, whose physicochemical parameters vary greatly.

We used cryo-TEM to better understand the supramolecular organization of cationic lipid/protein complexes. We observed that the mixing of BGTC:DOPE liposomes with  $\beta$ -gal at the optimal MR of 1,500 promoted aggregation, resulting in large, globally spherical complexes. Protein molecules were present within the aggregates and occasionally formed protein layers between two lipid membranes, so-called protein junctions. As  $\beta$ -gal molecule is a tetramer, it exposed several binding sites for liposome, promoting contacts between two lipid membranes and causing liposomal aggregation. Whereas liposomes were mostly free of protein at their surface at a MR of 1,500, lower MR complexes formed larger isolated objects decorated with proteins on their external surfaces. We hypothesized that protein coating on liposome surface observed at suboptimal MR, prevented liposome aggregation as well as interaction and fusion of liposome with the endosomal membrane. A tight contact between the lipoplex surface and the endosomal membrane is essential to promote mixing of lipids by “flip-flop” between the two bilayers, resulting in endosomal membrane destabilization and disruption.<sup>10,20,24</sup> As a result, the delivered protein is susceptible to degradation in the lysosome and is unable to access cytosol. Based on these observations, we suggest that the optimal ratio of 1,500 corresponds to a balance between two unfavorable situations. For lower ratios, the protein densities, exposed at the liposome surface, prevent the fusion between endosomal membranes and cationic lipids, while toxicity is induced at higher ratios reducing the delivery efficiency.

The study of the liposome structures formed by cationic lipids with the anti-K8 antibody highlights a different mechanism of delivery. DOSP:MM27/K8 showed a unique organization forming clusters of onion-like structures bearing antibodies on their surfaces but devoid of proteins. Such remodeling of cationic lipid-based assemblies to multilamellar concentric structures has already been described with cationic lipid/nucleic acid complexes.<sup>25</sup> This arrangement suggests that liposomes escape endosome through membrane disruption by a proton-sponge mechanism, while the large amount of MM27 per lipoplex offers a high buffering capacity. During endocytic trafficking, endolysosomes are acidified by the action of an ATPase enzyme that transports protons from the cytosol into the vesicle. It is proposed that MM27 prevents acidification of endocytic vesicles, causing the ATPase to transport more protons to reach acidic pH. The accumulation of protons in the vesicle is balanced by an influx of counter ions which ultimately causes osmotic swelling and rupture of the endosome membrane.<sup>26</sup> Through this mechanism, liposomes can be released into the cytosol without requiring a tight contact between the endosomal membrane and the lipoplexes.

Finally, we took advantage of the DOSP:MM27 delivery system to investigate the ability of anti-cytokeratin 8 antibodies to disrupt the interaction between cytokeratin 8 and F508del-CFTR. This interaction has previously been shown to impair the trafficking of this mutated channel toward the plasma membrane where it is partially functional, leading to cystic fibrosis.<sup>15,16,27</sup> The evaluation of transmembrane



**Figure 8 Rescue of F508del-CFTR activity by K8 antibody delivery.** (a) MEQ fluorescence assay was performed on WT-CFTR cells treated with DOSP:MM27/K8 (triangles), on F508del-CFTR cells treated with DOSP:MM27/antiK8 N-ter (diamonds) or DOSP:MM27/antiK8 C-ter (circle) and untreated F508del-CFTR cells (cross). The fluorescence ratio is calculated as  $(F/F_i) - 1$ ,  $F$  = Fluorescence intensity at indicated time points and  $F_i$  = Initial fluorescence intensity under iodide perfusion. (b) Quenching slopes of MEQ fluorescence registered for 30 seconds upon addition of cAMP and exchange of extracellular nitrate ( $NO_3^-$ ) for iodide ions ( $I^-$ ).

anionic efflux by MEQ fluorescence measurement showed that the delivery of antibodies against cytokeratin 8 led to the restoration of a cAMP-dependent anionic conductance at the surface of F508del-CFTR-expressing cells. These preliminary results have to be confirmed but strongly suggest that antibody-mediated disruption of the interaction between cytokeratin 8 and F508del-CFTR can restore the trafficking of this mutated channel towards the plasma membrane. This approach would provide a tool for the study of channelopathies and development of future therapeutic strategies.

#### Materials and methods

**Preparation of liposomes and micelles.** The lipids BGTC, DOSP, and MM27 were synthesized respectively as previously described.<sup>18,21</sup> The neutral lipid DOPE (dioleoylphosphatidyl-ethanolamine) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Liposome formulations were prepared



by dissolving a cationic lipid (BGTC or DOSP) alone or with a neutral lipid (MM27 or DOPE) in chloroform at a molar ratio of 1. The solvent was removed using a rotary evaporator under vacuum at room temperature and the lipidic film rehydrated with ultrapure water for 24 hours at 4 °C at a final concentration of 10 mmol/l. The resulting suspension was sonicated for 15 minutes to obtain liposomes of 100–200 nm diameter.

**Formulation of lipid/protein complexes.**  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) (Roche Applied Science, Penzberg, Germany), rabbit anti-cytokeratin 8 antibody (K8) (ab51152, Abcam, Cambridge, UK) or mouse fluorescein conjugated anti-cytokeratin 8 antibody (FITC-K8) (ab87010, Abcam) were diluted with pH 7.4 buffer solution (120 mmol/l NaCl, 20 mmol/l 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)) or OptiMEM (Life Technologies, Carlsbad, CA) medium to the indicated final concentration. Lipids were diluted in water or OptiMEM at lipid/protein molar ratios (MR) from 100 to 2,500 and added to protein solution (v/v). The resulting solution was mixed gently and incubated for 15 minutes at room temperature before incubation with cells.

**Polyacrylamide gel electrophoresis of lipid/protein complexes.** BGTC:DOPE/ $\beta$ -gal complexes were prepared with 10  $\mu$ g  $\beta$ -gal at various lipid/protein MR in pH 7.4 buffer solution (120 mmol/l NaCl, 20 mmol/l HEPES). After 15 minutes incubation at room temperature, 5  $\mu$ l of the preparation were mixed with 5  $\mu$ l Blue-Orange loading buffer (Promega, Madison, WI). Migration was performed on a nondenaturing polyacrylamide gel (5% stacking, 7% resolving) for 2 hours and the  $\beta$ -gal protein revealed by Coomassie blue staining.

**Spectrofluorometer analysis.** DOSP:MM27/anti-K8-FITC antibody complexes were formed in OptiMEM at various molar ratios (100–1,500) and incubated at room temperature for 15 minutes. Samples were centrifuged for 5 minutes at 13,000g and supernatants were removed for determination of anti-K8-FITC content using a Fluoromax-4 (Horiba scientific, Kyoto, Japan). A standard curve correlating fluorescence and anti-K8-FITC antibody concentration was used to determine the amount of residual free antibody presents in supernatant after complexation.

**Cell culture.** HeLa (human cervical adenocarcinoma), H1299 (human non-small cell lung carcinoma), and C2C12 (murine myoblasts cells) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies). HeLa cells expressing WT-CFTR or F508del-CFTR were cultured in DMEM supplemented with 450  $\mu$ g/ml Zeocin (Invivogen, San Diego, CA). CHO-K1 from hamster ovary was cultured in F12-K medium (Life Technologies). All media were supplemented with 2 mmol/l L-glutamine, 10  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 10% fetal calf serum obtained from Life Technologies. Cells were cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere.

**Protein transfection.** The day before transfection, cells were seeded at a density of  $\sim 7.0 \times 10^4$  cells per well of a 24-well plate in 0.5 ml of the appropriate complete growth medium to obtain 70–80% confluence the day of transfection. For each well, media was replaced 30 minutes before transfection with

0.4 ml of serum-free medium. Lipid/protein complexes prepared in 0.1 ml volume were added to cells. After 4 hours incubation, fetal calf serum was added at a final concentration of 10% and transfection was stopped at indicated time.

#### *$\beta$ -galactosidase activity assays*

**$\beta$ -gal expression quantification.** Cells were washed three times with PBS 1 $\times$  and lysed with 0.3 ml of Reporter Lysis Buffer (Promega) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science). One freeze-thaw cycle was performed to ensure complete lysis.  $\beta$ -gal expression was quantified using the  $\beta$ -Glo Assay system from Promega according to manufacturer instructions. The amount of  $\beta$ -gal originally used for complexation (600, 800, or 1,000 ng) was used as control and arbitrarily fixed at 100%. Luminescence was read using the Victor-X3 multilabel plate reader (Perkin-Elmer, Waltham, MA).

**Staining of  $\beta$ -gal-containing cells.** HeLa cells were grown on glass coverslips. After treatment, cultures were washed three times with PBS 1 $\times$ , fixed with 3.7% paraformaldehyde at room temperature and incubated in staining solution (400  $\mu$ g/ml X-gal, 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 4 mmol/l K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 4 mmol/l K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]). Slides were mounted with PBS in the presence of glycerol (50% v/v) and observed under an optical microscope.

**MTT assay.** After treatments, cells were washed, medium was replaced by 100  $\mu$ l 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium (MTT) per well (1 mg/ml) diluted in complete medium, and cells were incubated at 37 °C for 4 hours. Then MTT solution was replaced by dimethyl sulfoxide (DMSO) (100  $\mu$ l/well) and optical density was recorded at 550 nm. All assays were performed in triplicate.

**Fluorescence microscopy.** The internalization and intracellular fate of the FITC-K8 antibody was visualized 4 and 24 hours following lipid transfection. Cells were washed with PBS and fixed with 3.7% paraformaldehyde solution for 10 minutes at room temperature. Glass coverslips were mounted with ProLong antifade DAPI reagent (Life Technologies) and visualized with a Zeiss (Oberkochen, Germany) Axiovert epifluorescence microscope.

In order to confirm the association of the FITC-K8 antibody with its K8 target, cells were first transfected with the mouse FITC-K8 using DOSP:MM27 liposome, fixed and subsequently stained with the rabbit anti-K8 and a secondary anti-rabbit AlexaFluor 546. In brief, cells were fixed in PBS containing 3.7% paraformaldehyde and permeabilized with PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA) (Sigma) and 0.1% saponin (Sigma, Saint-Louis, MO) for 20 minutes. Cells were washed with PBS, blocked with 10% goat serum diluted in PBS-4% BSA-0.1% saponin for 1 hour. Coverslips were then incubated with anti-K8 (1:200 dilution) antibodies overnight at 4 °C. Cells were rewashed and incubated for 1 hour with goat anti-rabbit AlexaFluor 546 (1:2,000 dilution) (Life Technologies) and mounted with ProLong antifade DAPI reagent. Colocalization was visualized using a laser-scanning confocal microscope (Carl Zeiss). Images were treated using ImageJ 1.42q software.

**Cryo-TEM.** Cryo-TEM imaging of cationic lipid/protein complexes were performed as previously described.<sup>28</sup> Complexes were formulated in 120 mmol/l NaCl and 20 mmol/l HEPES,

pH 7.4, and a 5 µl sample drop was applied to 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 ~-170 °C, using a cryo holder, with a FEI Tecnai F20 electron microscope operating at 200 kV. Images were recorded with a 2k × 2k SlowScan CCD camera (Gatan) at a nominal magnification of 50,000x under low-dose conditions.

**MEQ fluorescence assay.** HeLa cells stably expressing WT-CFTR or F508del-CFTR were grown on glass coverslips for 24 hours and K8 antibody was delivered using DOSP:MM27 in serum-free medium (RM1500, 1.5 µg antibody). Four hours after antibody treatment, MEQ probe was loaded into cells by hypotonic shock permeabilization. Cells were washed with an iodide-containing isotonic solution (138 mmol/l NaI, 2.4 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mmol/l HEPES, 1 mmol/l CaSO<sub>4</sub>, 10 mmol/l D-glucose, pH 7.4) and incubated for 2 minutes in a hypotonic solution containing the halide-sensitive probe, MEQ (Life Technologies) (10 mmol/l MEQ, 110 mmol/l NaI, 1.92 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.64 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mmol/l HEPES, 0.8 mmol/l CaSO<sub>4</sub>, 8 mmol/l D-Glucose, pH 7.4). Hypotonic solution was removed and cells incubated with the isotonic solution for 15 minutes recovery. Coverslips were mounted in perfusion chamber continuously supplied with the isotonic solution at 37 °C, and basal fluorescence level observed under a Leica DMI6000B epifluorescence microscope equipped with environmental control. Cells were subsequently perfused with a nitrate-containing solution (138 mmol/l NaNO<sub>3</sub>, 2.4 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mmol/l HEPES, 1 mmol/l CaSO<sub>4</sub>, 10 mmol/l D-Glucose, pH 7.4) and a cAMP stimulatory cocktail (500 µmol/l cptAMPc, 25 µmol/l forskolin, 100 µmol/l IBMX) was added to initiate channel opening. After 180 seconds, nitrate-containing solution was finally replaced by iodide isotonic solution to quench MEQ fluorescence. Intracellular fluorescence was monitored over time using MetaFluor software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Results are expressed as relative fluorescence ( $F/F_1$ ) - 1,  $F$  is the fluorescence intensity at time points indicated on the x-axis after background subtraction and compensation of MEQ photobleaching, and  $F_1$  the basal MEQ fluorescence obtained under iodide perfusion.

**Acknowledgments.** The authors are very grateful to the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) for excellent technical expertise in cell imaging. They are also indebted to Pierre and Jean-Marie Lehn for their pioneer works related to the synthesis of cationic lipids used in this study and also to Paul-Alain Jaffres for his work on imidazole based-lipids. This work was supported by special grants from the “Association Française contre les Myopathies” (Evry, France), from “Agence Nationale de la Recherche” (Paris, France) for IHU-CESTI, and from BPIFrance financement (Paris, France) for Emerit and Hepavac.

1. Fintini, D, Brufani, C and Cappa, M (2009). Profile of mecamermin for the long-term treatment of growth failure in children and adolescents with severe primary IGF-1 deficiency. *Theor Clin Risk Manag* 5: 553–559.
2. Aviezer, D, Brill-Almon, E, Shaatit, Y, Hashmueli, S, Bartfeld, D, Mizrahi, S et al. (2009). A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme—a preclinical and phase I investigation. *PLoS One* 4: e4792.
3. Maloney, DG (2012). Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 366: 2008–2016.

4. Ho, A, Schwarze, SR, Mermelstein, SJ, Waksman, G and Dowdy, SF (2001). Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 61: 474–477.
5. Järver, P and Langel, U (2006). Cell-penetrating peptides—a brief introduction. *Biochim Biophys Acta* 1758: 260–263.
6. Zephati, O, Wang, Y, Kitada, S, Reed, JC, Felgner, PL and Corbeil, J (2001). Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system. *J Biol Chem* 276: 35103–35110.
7. Dalkara, D, Zuber, G and Behr, JP (2004). Intracytoplasmic delivery of anionic proteins. *Mol Ther* 9: 964–969.
8. van der Gun, BT, Monami, A, Laarmann, S, Raskó, T, Slaska-Kiss, K, Weinhold, E et al. (2007). Serum insensitive, intranuclear protein delivery by the multipurpose cationic lipid SAINT-2. *J Control Release* 123: 228–238.
9. Noble, GT, Stefanick, JF, Ashley, JD, Kiziltepe, T and Bilgicer, B (2014). Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends Biotechnol* 32: 32–45.
10. Le Bihan, O, Chèvre, R, Mornet, S, Garnier, B, Pitard, B and Lambert, O (2011). Probing the *in vitro* mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale. *Nucleic Acids Res* 39: 1595–1609.
11. Wasungu, L and Hoekstra, D (2006). Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release* 116: 255–264.
12. Barteau, B, Chèvre, R, Letrou-Bonneval, E, Labas, R, Lambert, O and Pitard, B (2008). Physicochemical parameters of non-viral vectors that govern transfection efficiency. *Curr Gene Ther* 8: 313–323.
13. White, MB, Amos, J, Hsu, JM, Gerrard, B, Finn, P and Dean, M (1990). A frame-shift mutation in the cystic fibrosis gene. *Nature* 344: 665–667.
14. Denning, GM, Anderson, MP, Amara, JF, Marshall, J, Smith, AE and Welsh, MJ (1992). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 358: 761–764.
15. Colas, J, Faure, G, Sausseureau, E, Trudel, S, Rabeh, WM, Bitam, S et al. (2012). Disruption of cytokeratin-8 interaction with F508del-CFTR corrects its functional defect. *Hum Mol Genet* 21: 623–634.
16. Lipecka, J, Norez, C, Bensalem, N, Baudouin-Legros, M, Planelles, G, Becq, F et al. (2006). Rescue of DeltaF508-CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) by curcumin: involvement of the keratin 18 network. *J Pharmacol Exp Ther* 317: 500–505.
17. Vigneron, JP, Oudrhiri, N, Fauquet, M, Vergely, L, Bradley, JC, Basseville, M et al. (1996). Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9682–9686.
18. Mével, M, Sainlos, M, Chatin, B, Oudrhiri, N, Hauchecorne, M, Lambert, O et al. (2012). Paromomycin and neomycin B derived cationic lipids: synthesis and transfection studies. *J Control Release* 158: 461–469.
19. Desigaux, L, Sainlos, M, Lambert, O, Chevre, R, Letrou-Bonneval, E, Vigneron, JP et al. (2007). Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 16534–16539.
20. Zuhorn, IS and Hoekstra, D (2002). On the mechanism of cationic amphiphile-mediated transfection. To fuse or not to fuse: is that the question? *J Membr Biol* 189: 167–179.
21. Mével, M, Neveu, C, Gonçalves, C, Yaouanc, J-J, Pichon, C, Jaffrés, P-A, et al. (2008). Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays. *Chem Commun Camb Engl* 27: 3124–3126.
22. Billiet, L, Gomez, J-P, Berchel, M, Jaffrés, P-A, Le Gall, T, Montier, T et al. (2012). Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line. *Biomaterials* 33: 2980–2990.
23. Midoux, P, Pichon, C, Yaouanc, J-J and Jaffrés, P-A (2009). Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* 157: 166–178.
24. Xu, Y and Szoka, FC (1996). Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection *Biochemistry (Mosc.)* 35: 5616–5623.
25. Pitard, B, Oudrhiri, N, Vigneron, JP, Hauchecorne, M, Aguerre, O, Tourny, R et al. (1999). Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2621–2626.
26. Pack, DW, Hoffman, AS, Pun, S and Stayton, PS (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov* 4: 581–593.
27. Davezac, N, Tondelier, D, Lipecka, J, Fanen, P, Demaugre, F, Debski, J et al. (2004). Global proteomic approach unmasks involvement of keratins 8 and 18 in the delivery of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/deltaF508-CFTR to the plasma membrane. *Proteomics* 4: 3833–3844.
28. Pitard, B, Bello-Roufai, M, Lambert, O, Richard, P, Desigaux, L, Fernandes, S et al. (2004). Negatively charged self-assembling DNA/polyamine nanospheres for *in vivo* gene transfer. *Nucleic Acids Res* 32: e159.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



## **Chapitre 3 : Etude du mécanisme de délivrance de protéines**

### **Chapitre 3 : Etude du mécanisme de délivrance de protéines**

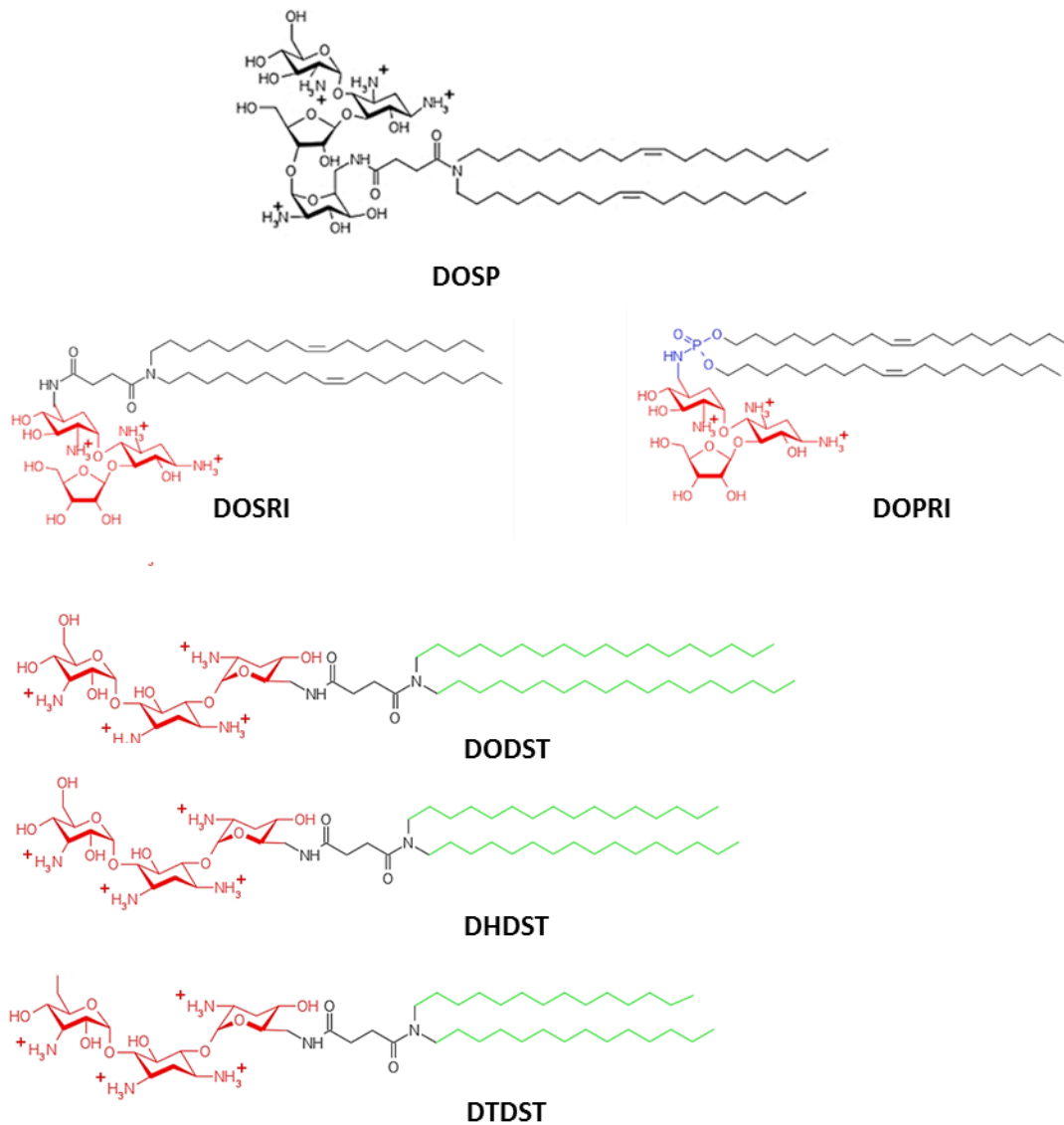
La délivrance de protéines biologiquement actives dans la cellule apparaît comme une stratégie importante pour les applications fondamentales et thérapeutiques. Des expériences antérieures ont montré que les dérivés lipidiques d'aminoglycosides (lipoaminoglycoside) étaient capables de délivrer *in vitro* l'anticorps anti-cytokératine 8 (anti-K8), mais seulement lorsqu'il était formulé avec un système composé d'un lipide cationique combiné avec un colipide pour l'échappement endosomal, ce qui a entraîné une complexité par un excès de lipides. Ici, nous avons conçu un système de délivrance d'anti-K8 *in vitro* avec divers lipoaminoglycosides en l'absence de colipides. Les résultats ont conduit à l'identification du lipoaminoglycoside dioleyle phosphoramidate ribostamycine (DOPRI) en tant que puissant système de délivrance intracellulaire pour l'anti-K8. La microscopie corrélative révèle que les molécules d'anti-K8 délivrées ont été liées efficacement aux filaments intermédiaires. Des techniques de biophysiques et de biologies cellulaires ont été réalisées pour déchiffrer le mécanisme d'action de DOPRI. Les anticorps anti-K8 sont liés à la surface de DOPRI sans perturbation de l'organisation des lipides. Les complexes sont stables sous un pH faible ou une concentration élevée de NaCl mais ont été déstabilisés en présence de lipides anioniques. Comme révèlent les expériences avec les inhibiteurs des voies d'endocytose, la macropinocytose et l'endocytose par les cavéoles ont contribué à l'internalisation d'anti-K8 et aussi au marquage des filaments avec une contribution majeure pour la voie cavéolaire. La microscopie électronique par transmission (TEM) et le cryo-TEM ont montré que les complexes DOPRI/anti-K8 forment de petites et grandes vésicules dont les tailles étaient compatibles avec l'endocytose par les deux voies identifiées. Les résultats ont clairement montré que les propriétés uniques de DOPRI étaient suffisantes pour une délivrance efficace de protéines intracellulaires sans nécessiter de colipide.

**Les résultats détaillés ici ont fait l'objet d'une publication en cours de soumission dans *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*.**

## A. Criblage de différents lipides cationiques

Dans des études précédentes, nous avons déjà utilisé avec succès un lipide seul pour délivrer des molécules d'acide nucléique telles que l'ADN, les siRNA et les ARNm à l'intérieur des cellules (Desigaux et al., 2007; Habrant et al., 2016; Mével et al., 2012). La famille des lipides utilisée est dérivée de molécules naturelles à base d'aminoglycosides capables d'interagir spécifiquement avec des acides nucléiques. Compte tenu de la flexibilité de leur partie polaire, les aminoglycosides peuvent également convenir à la liaison à des résidus d'acides aminés d'anticorps impliquant des liaisons hydrogènes et des interactions électrostatiques.

Afin d'identifier un seul composé lipidique capable de délivrer un anticorps dans le cytoplasme, nous avons choisi des représentants de cette famille en prenant différentes parties polaires, bras espaceurs et parties hydrophobes. Ces différents vecteurs ont été utilisés afin de délivrer l'anticorps anti-cytokératine 8 couplé au fluorophore FITC (anti-K8). Cet anticorps marque une protéine du cytosquelette et plus particulièrement une protéine des filaments intermédiaires. L'efficacité d'internalisation et de délivrance a été observée par microscopie à fluorescence. De nombreuses conditions ont été testées en modifiant le type de vecteur, la quantité de protéine à délivrer et la quantité de lipide cationique. La majorité des vecteurs utilisés dans ce criblage ont été testés dans des études antérieures pour la délivrance d'acides nucléiques sauf les dérivés lipidiques dérivés de ribostamycine (Figure 46).

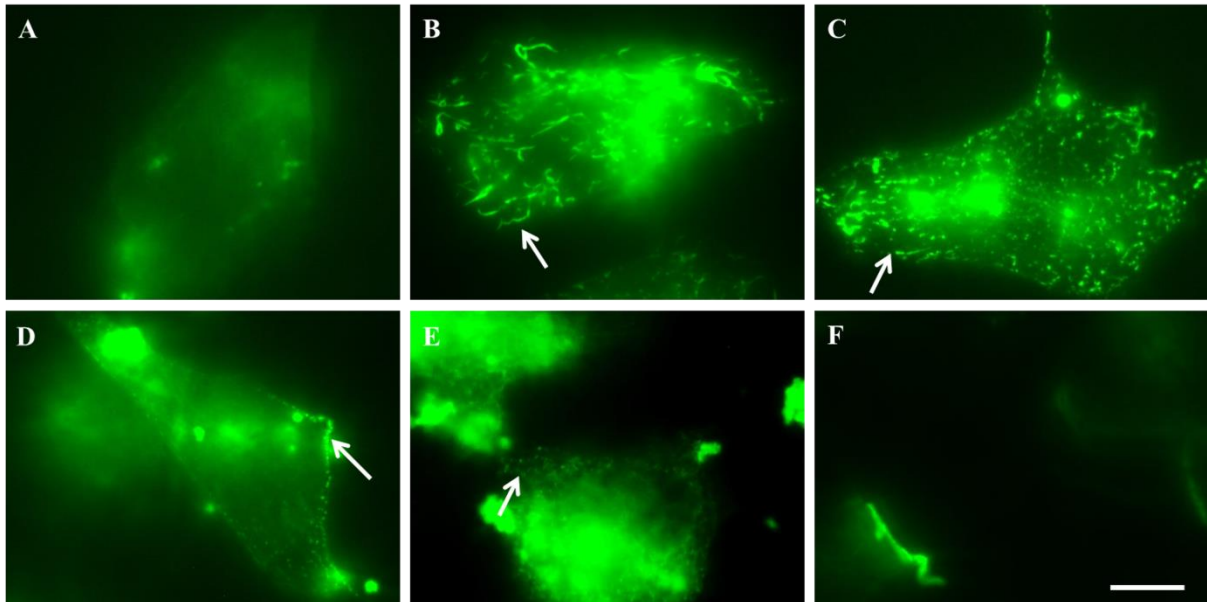


**Figure 46 : Structures des lipides cationiques pour la délivrance de protéines**

Modification du bras espaceur (bleu), de la tête polaire (rouge) ainsi que la longueur de la chaîne hydrophobe (vert) par rapport au lipide de référence DOSP.

Le dérivé lipidique de la paromomycine, **DOSP** possède deux chaînes dioleyle (C18) liées à la tête polaire d'aminoglycoside paromomycine via un bras espaceur succinyle. Cette molécule nous sert de référence pour la construction des autres composés. Le lipide cationique **DOSRI** a la même longueur de chaînes hydrophobes et le même bras espaceur que DOSP mais varie de par la nature de sa tête polaire (ribostamycine). Dérivé du lipide DOSRI, le composé **DOPRI** a été synthétisé. Il possède la même longueur de chaînes hydrophobes (C18) que

DOSP mais la tête polaire est la ribostamycine séparée par un bras espaceur phosphoramide. Enfin, trois molécules dérivées de la tobramycine ont été synthétisées. Elles possèdent le même bras espaceur (succinyl) que DOSP. La tête polaire paromomycine est remplacée par la tobramycine et trois longueurs de chaînes hydrophobes sont ajoutées. **DSST** a deux chaînes stéariques (C18), **DPST** a deux chaînes palmitiques (C16) et **DMST** a deux chaînes myristiques (C14).



**Figure 47 : Délivrance de l'anticorps anti-cytokératine 8 FITC dans des cellules HeLa vivantes**

Les cellules ont reçu 800ng d'anticorps complexé au rapport molaire 1500 à différents lipides: (A) DOSP, (B) DOSRI, (C) DOPRI (D) DSST (E) DPST (F) DMST. Après 4 heures d'incubation, les cellules ont été lavées et fixées avant observation au microscope à épifluorescence. Barre d'échelle : 10µm

Les différents lipides testés au cours de ce criblage ont été formulés à 800ng d'anticorps et à un rapport molaire lipide cationique/protéine de 1500. Ces conditions ont déjà été testées dans l'étude précédente et se trouvent être optimal pour étudier la délivrance intracellulaire de protéines.

La Figure 47 montre les observations de microscopie à épifluorescence des différents lipides cationiques utilisés sous la forme micellaire. Nous avons évalué l'efficacité des dérivés lipidiques de la paromomycine (Figure 47A), de la ribostamycine (Figure 47B et 47C) et de la tobramycine (Figure 47D-F) pour la délivrance des anticorps anti-K8. DOSP ne présente aucune cellule avec marquage du cytosquelette (Figure 47A) et ne permet pas la délivrance

intracellulaire d'anticorps. Afin de vérifier si le changement de la tête polaire permet d'améliorer la transfection, un nouveau lipide cationique a été synthétisé. La paromomycine de la tête polaire est remplacée par une ribostamycine. Ce lipide présente un fort marquage fluorescent des filaments (flèche blanche) (Figure 47B). Avec ce lipide, un grand nombre de cellules ont un marquage des filaments intermédiaires (environ 48%).

Ensuite, nous nous sommes intéressés à savoir si en modifiant le bras espaceur, nous pouvons augmenter l'efficacité de transfection. Le lipide cationique ayant une tête polaire de ribostamycine et un bras espaceur court (phosphoramidate) a été synthétisé. Nous avons observé que de nombreuses cellules présentaient un marquage fluorescent intense du cytosquelette (environ 60%) (Flèche blanche) (Figure 47C). Le marquage intracellulaire des filaments est caractéristique d'un marquage des filaments intermédiaires.

Enfin, afin de vérifier si la longueur de la chaîne a un impact sur l'efficacité de transfection, trois lipides cationiques DSST, DPST et DMST ont été synthétisés avec la même tête polaire tobramycine, le même bras espaceur et avec seulement un changement de la longueur des chaînes lipidiques (C18, C16 et C14 respectivement). Seules les chaînes lipidiques longues (DPST et DPST) ont des cellules qui ont un faible marquage fluorescent des filaments (2% et 1% respectivement) (Figure 47D et 47E). La DMST n'a montré aucune cellule avec marquage du cytosquelette (Figure 47F). Le lipide cationique qui présente une meilleure efficacité de transfection possède une tête polaire ribostamycine, un bras espaceur phosphoramidate et une chaîne lipidique dioléyl. Par conséquent, pour les expériences, nous avons utilisé le lipide cationique DOPRI qui a une haute efficacité pour délivrer des anticorps dans le cytosol des cellules.

## B. Caractérisation morphologique des complexes par ME

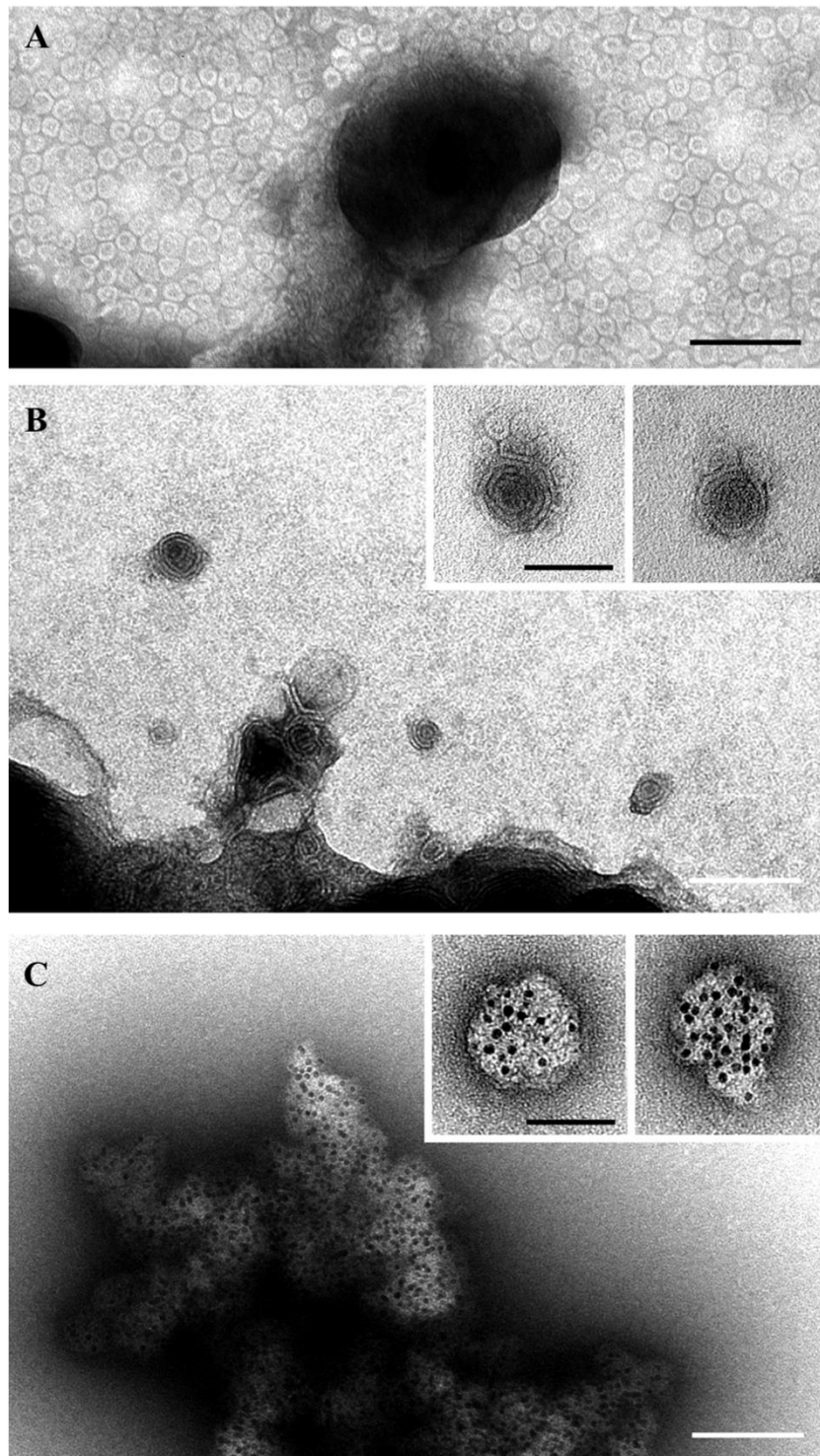
### 1. Caractérisation des complexes par coloration négative

Le lipide cationique DOPRI ainsi que les complexes lipides/protéines ont été caractérisés par microscopie électronique à transmission en coloration négative dans le milieu de complexation OptiMEM (Figure 48). Cette technique repose sur la préparation d'échantillons en utilisant un support. La coloration négative est utilisée pour voir tous les objets composant le mélange comparé à la cryo-MET qui retient préférentiellement les gros objets et exclut les petits objets sur la grille. Cependant, la cryo-MET a été utilisée afin d'étudier les structures des gros objets qui ne sont pas bien résolus en coloration négative.

En coloration négative, le lipide cationique DOPRI forme de très petites vésicules de l'ordre de 15-25nm de diamètre et de larges vésicules (>100nm) (Figure 48A). Le nombre important de petites vésicules est sûrement dû à la présence du support carboné qui facilite leur attachement. Les complexes DOPRI/anti-K8 forment des petites vésicules isolées concentriques et multilamellaires d'un diamètre allant de 30nm à 80nm (Figure 48B). On retrouve également des amas (> 500nm) de structures multilamellaires et concentriques.

Afin de vérifier si l'anticorps est présent sur nos vésicules observées en microscopie électronique à transmission, un marquage avec la protéine A couplée à l'or colloïdal a été réalisé (Figure 48C). La protéine A présente une forte affinité avec les IgG1 et IgG2 humains. On observe qu'après accrochage de la protéine A couplée à l'or colloïdal, les petites vésicules ainsi que les larges complexes sont recouverts de particules d'or à leur surface. Ces résultats suggèrent la présence de l'anticorps anti-K8 à la surface de ces structures. Ce marquage est spécifique à l'anticorps anti-K8 puisque l'on ne retrouve pas ou peu de marquage à l'or sur le contrôle négatif.



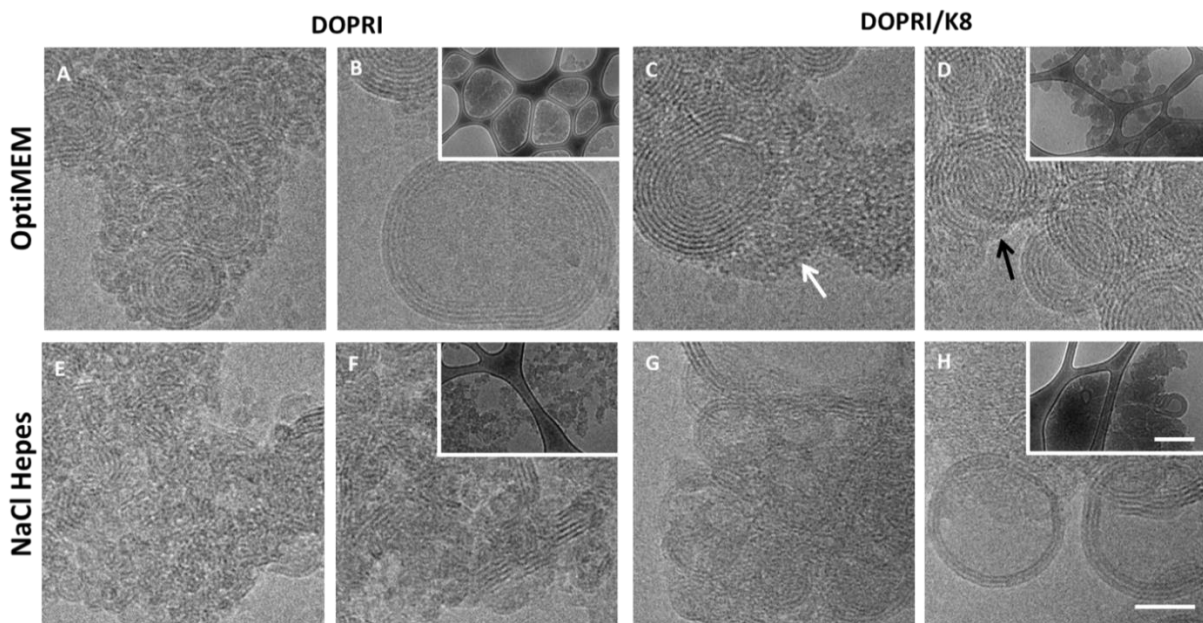


**Figure 48 : Images de MET en coloration négative de DOPRI et des complexes lipides/anti-K8.**  
 (A) Solution de DOPRI pur contient des petits et gros liposomes (B) Complexes DOPRI/anti-K8 Insert: agrandissement de petites vésicules. (C) Complexes DOPRI/anti-K8 marqués par la protéine A couplée à des particules d'or Insert: agrandissement de petites vésicules marquées. Barres d'échelles: 100nm et insert 50nm.

## 2. Caractérisation des complexes par cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-MET)

Les caractéristiques morphologiques des complexes ont été observés en cryo-MET obtenues en mélangeant l'anticorps anti-K8 et le lipide cationique DOPRI dans deux milieux de complexation. L'organisation et la structuration des complexes dans le milieu de complexation OptiMEM (Figure 49A-D) et dans une solution tampon de NaCl-Hepes (Figure 49E-H) à un ratio molaire de 375 ont été observées.

Dans le milieu OptiMEM, DOPRI forme des vésicules multilamellaires sphériques et des vésicules de très petits diamètres (15-20nm) en accord avec les observations de coloration négative. Ces petites vésicules semblent attachées aux vésicules multilamellaires conduisant à de larges assemblages hétérogènes (> 1µm) (Figure 49A et 49B).



**Figure 49 : Images de cryo-MET de DOPRI et des complexes DOPRI/anti-K8.**

La formulation micellaire DOPRI a été préparé dans deux milieux de complexation différents : (A-D) optiMEM ou (E-H) NaCl 20mM Hepes 100mM pH 7,4, en absence (A-B et E-F) ou en présence d'anticorps anti-K8 (C-D et G-H) Barre d'échelle : 50nm et insert 250nm

En présence de l'anticorps anti-K8, des agrégats de plus de 1 micron sont formés dus à l'interaction entre la protéine et le lipide (Figure 49C et 49D). A la périphérie des vésicules multilamellaires, quelques zones denses semblent être visibles correspondant aux molécules d'anticorps (flèche noire Figure 49C). Les très petites vésicules ne sont pas bien définies et forment de larges agrégats (flèche blanche Figure 49C). Les molécules d'anticorps

interagissent avec la surface des liposomes DOPRI conduisant à la formation de structures concentriques multilamellaires de 250nm de diamètre.

Dans la solution tampon NaCl-Hepes, les liposomes DOPRI ne présentent aucune structuration particulière. On remarque des fragments multilamellaires compactés conduisant à la formation de larges agrégats ( $> 1\mu\text{m}$ ). En revanche, en présence de l'anticorps anti-K8, quelques vésicules lamellaires (de 80nm de diamètre) co-existent avec des agrégats de protéines.

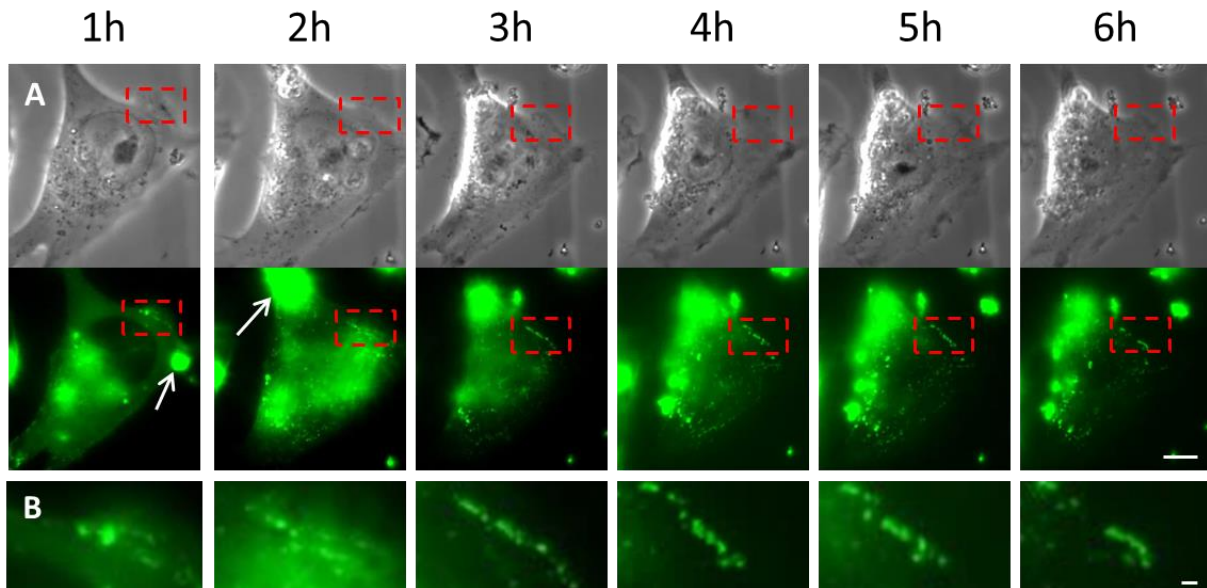
Les observations de cryo-microscopie électronique nous permettent de comprendre quelle est la meilleure organisation et structuration des complexes pour avoir une efficacité de transfection importante. Ce lipide cationique forme des organisations plus ou moins structurées selon le milieu de complexation. Dans les deux milieux de complexation, l'ajout de la protéine aux lipides cationiques permet une organisation structurale des complexes. On remarque que dans le milieu NaCl Hepes, l'ajout de la protéine modifie l'organisation lipidique mais forme des structures moins organisées comparé au milieu de complexation optiMEM. Dans le milieu optiMEM, les complexes présentent des arrangements sphériques multilamellaires. Cette organisation semble similaire à l'interaction observé avec DOSP/MM27 qui a déjà été décrit dans l'étude précédente (Chatin et al., 2015) pour la délivrance de protéine dans des cellules vivantes. Il semblerait que ces structures soient nécessaires pour induire l'internalisation et la délivrance de la protéine. Les structures très organisées et condensées montrent l'importance morphologique de la formulation lipidique. De plus, la différence morphologique entre les milieux de complexation indique l'importance du milieu de formulation pour l'internalisation et la délivrance de macromolécules. Ces résultats font écho à ceux obtenus pour la délivrance des acides nucléiques. Ces résultats suggèrent que le milieu de complexation optiMEM est le plus adapté pour la délivrance de la protéine dans les cellules vivantes.

## **C. Délivrance et distribution des anticorps**

### **1. Cinétique de la délivrance des anticorps**

Dans le but d'évaluer l'évolution du signal fluorescent de l'anticorps au cours du temps, nous avons observé une même cellule vivante pendant 6 heures en microscopie à fluorescence. Les cellules ont étéensemencées sur des supports quadrillées (MatTek) afin de

pouvoir repérer une cellule et la suivre au cours du temps. Après avoir incubés les complexes sur les cellules, toutes les heures, une même cellule est observée en microscopie à épifluorescence (Figure 50).



**Figure 50 : Cinétique de la délivrance des complexes DOPRI/anti-K8 par microscopie à fluorescence.**

Les cellules HeLa ont été observées 1 heure après incubation avec les complexes et toutes les heures jusqu'à 6 heures (A) Images en contraste de phase et fluorescentes (FITC) de la même cellule. L'internalisation d'anti-K8 est observée comme des spots intenses fluorescents (flèche blanche) et des spots faibles (carré rouge en pointillé). (A) Echelle 10 $\mu$ m. (B) Agrandissement de la région d'intérêt (carré rouge en A) montrant un filament progressivement marqué atteignant un signal fluorescent optimal à 4 heures. Barre d'échelle 2 $\mu$ m

Après 1 heure d'incubation avec les complexes, les cellules internalisent les complexes fluorescents qui apparaissent comme des spots intenses de fluorescence (flèche blanche). Des spots de fluorescence peu intense sont visibles à proximité du noyau de la cellule (carré rouge). Au cours du temps, les complexes sont de plus en plus internalisés par la cellule. Si on se focalise sur la région d'intérêt (carré rouge), on remarque que le signal de fluorescence s'intensifie et progressivement s'organise en une structure linéaire et continue au bout de 4 heures d'incubation. Après 4 heures, le signal tend à disparaître (Figure 50B). A noter qu'aucun signal fluorescent n'est observé lorsque les cellules sont incubées avec l'anticorps seul. La cinétique de la délivrance de l'anticorps anti-K8 via DOPRI indique que l'anticorps anti-K8 est graduellement internalisé et délivré dans le cytoplasme démontrant la capacité de DOPRI à délivrer les anticorps. Ces résultats suggèrent que l'internalisation est un phénomène dynamique. Il a été démontré précédemment (Chatin et al., 2015) que les filaments intermédiaires sont marqués par l'anticorps anti-K8, ces résultats suggèrent que la

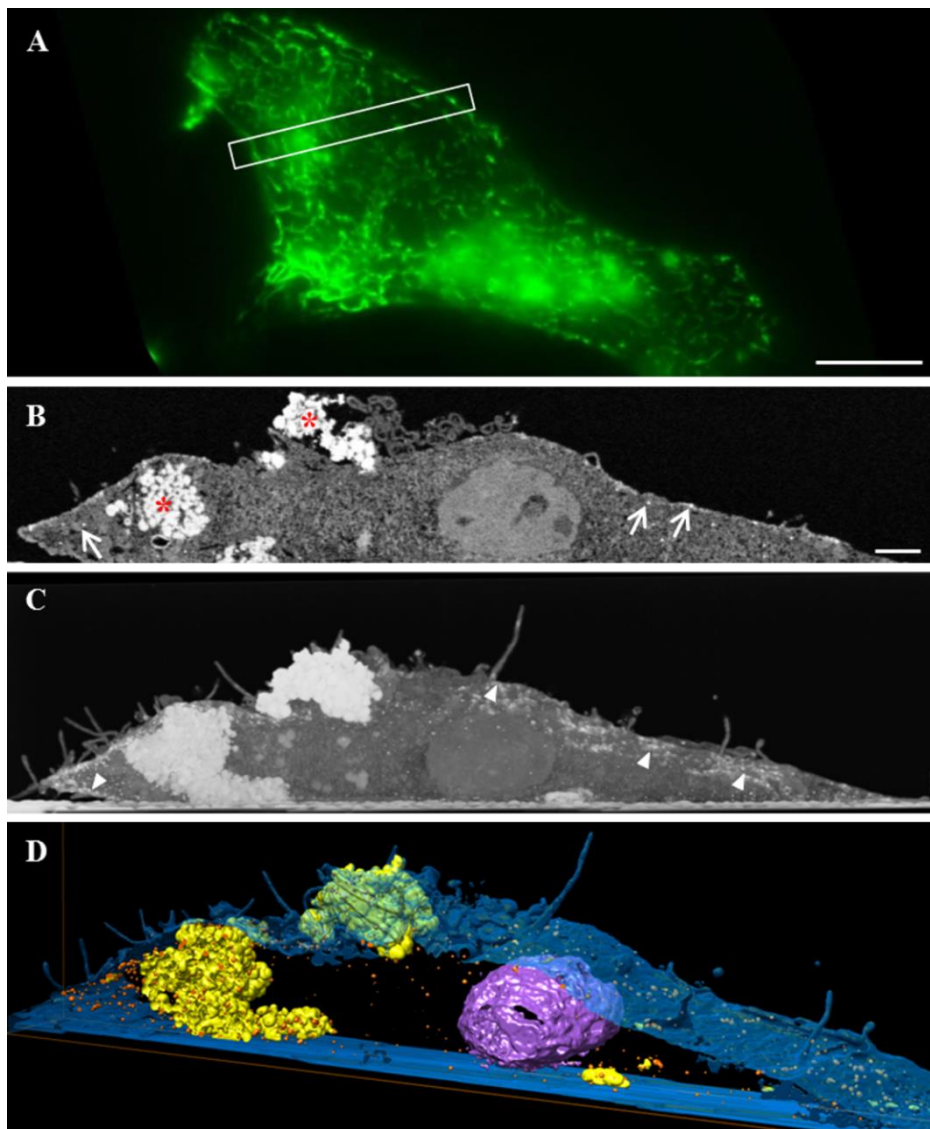
quantité de molécules d'anticorps atteignant leur cible sur des filaments intermédiaires s'accumule dans le temps jusqu'à 4 heures d'incubation. Pour la suite des expériences, nous nous placerons à 4 heures d'incubation.

## 2. Visualisation en 3D de la répartition de l'anticorps par FIB-SEM

Même si notre approche d'imagerie fluorescente dévoile clairement les filaments marqués par les anticorps anti-K8, seul le signal le plus intense est détectable, ce qui donne une vue partielle de la présence des molécules d'anti-K8 dans le cytoplasme. Pour obtenir une image plus résolue de la distribution des anticorps anti-K8 dans la cellule, la microscopie électronique à balayage par faisceaux d'ions focalisés (FIB-SEM) qui fournit une vue 3D d'une cellule à une résolution de quelques nanomètres est bien adaptée. Cependant, l'échantillonnage peut se faire sur une région de cellule limitée et le temps d'acquisition est relativement long et coûteux (supérieur à une nuit). Afin de visualiser les anticorps en microscopie électronique, une technique d'immunomarquage combinant un anticorps secondaire marqué à l'or et une étape d'amplification d'argent ont été effectuées pour une visualisation des anticorps anti-K8 avant l'analyse par FIB-SEM.

La distribution des particules d'or a été analysée sur une portion de cellule de 23 x 5,6 x 2,5 $\mu$ m telle qu'illustrée sur la Figure 51A. Sur une section de FIB-SEM de 10nm d'épaisseur, le contour de la cellule est clairement délimité tandis que les densités cellulaires apparaissent sous forme de densités grises sans structures subcellulaires distinctes à l'exception du nucléole circulaire. Dans la cellule, les structures denses aux électrons correspondent aux complexes DOPRI et aux particules d'or (Figure 51B). Le tomogramme 3D et sa projection 2D montrent qu'un grand nombre de particules d'or sont présentes dans la cellule. Environ 1500 particules ont été comptées en utilisant une segmentation automatique du volume de FIB-SEM fournissant une estimation raisonnable de la quantité d'anti-K8 délivrée dans cette partie de cellule. Elles sont localisées près des complexes DOPRI et aussi près de la membrane plasmique sur les deux côtés de la cellule (basal et apical) (Figure 51C et 51D). Cela suggère que les anticorps anti-K8 sont attachés ou près des complexes DOPRI en bon accord avec l'observation fluorescente. Plus intéressant encore, le résultat de FIB-SEM révèle des molécules d'anti-K8 largement réparties au voisinage de la membrane plasmique qui ne sont pas visibles par microscopie à fluorescence. Il y a en effet

plus de molécules d'anti-K8 que celles visibles sur les filaments en microscopie à fluorescence et elles sont distribuées dans tout le cytoplasme.



**Figure 51 : Visualisation 3D de la distribution des anticorps anti-K8 dans la cellule par la tomographie automatisée FIB-SEM.**

La cellule HeLa incubée avec des complexes DOPRI/anti-K8 a été marquée par un anticorps couplé aux billes d'or et soumise à des étapes de coupe et de lecture séquentielle automatisées. A) Une image fluorescente de l'anti-K8 délivré avant l'analyse FIB-SEM. Un rectangle de 23 x 5,6 x 2,5 $\mu$ m délimite la partie de cellule visualisée par FIB-SEM. B) Une tranche FIB-SEM de 10nm d'épaisseur visualisant la cellule parallèlement au support. La direction de coupe est indiquée par la double flèche dans (A). En blanc, les objets denses aux électrons correspondent aux particules d'or (flèches blanches) et aux complexes lipidiques (astérisques). C) Une projection 2D du tomogramme révèle la distribution majoritaire des particules d'or proches de la membrane plasmique (têtes de flèches blanches). D) Une représentation en surface de la tomographie 3D correspondante. Les lipides, la membrane plasmique, le nucléole, les particules d'or sont représentées respectivement en jaune, bleu, violet et orange. Barres d'échelle 10 $\mu$ m (A) et 1 $\mu$ m (B).

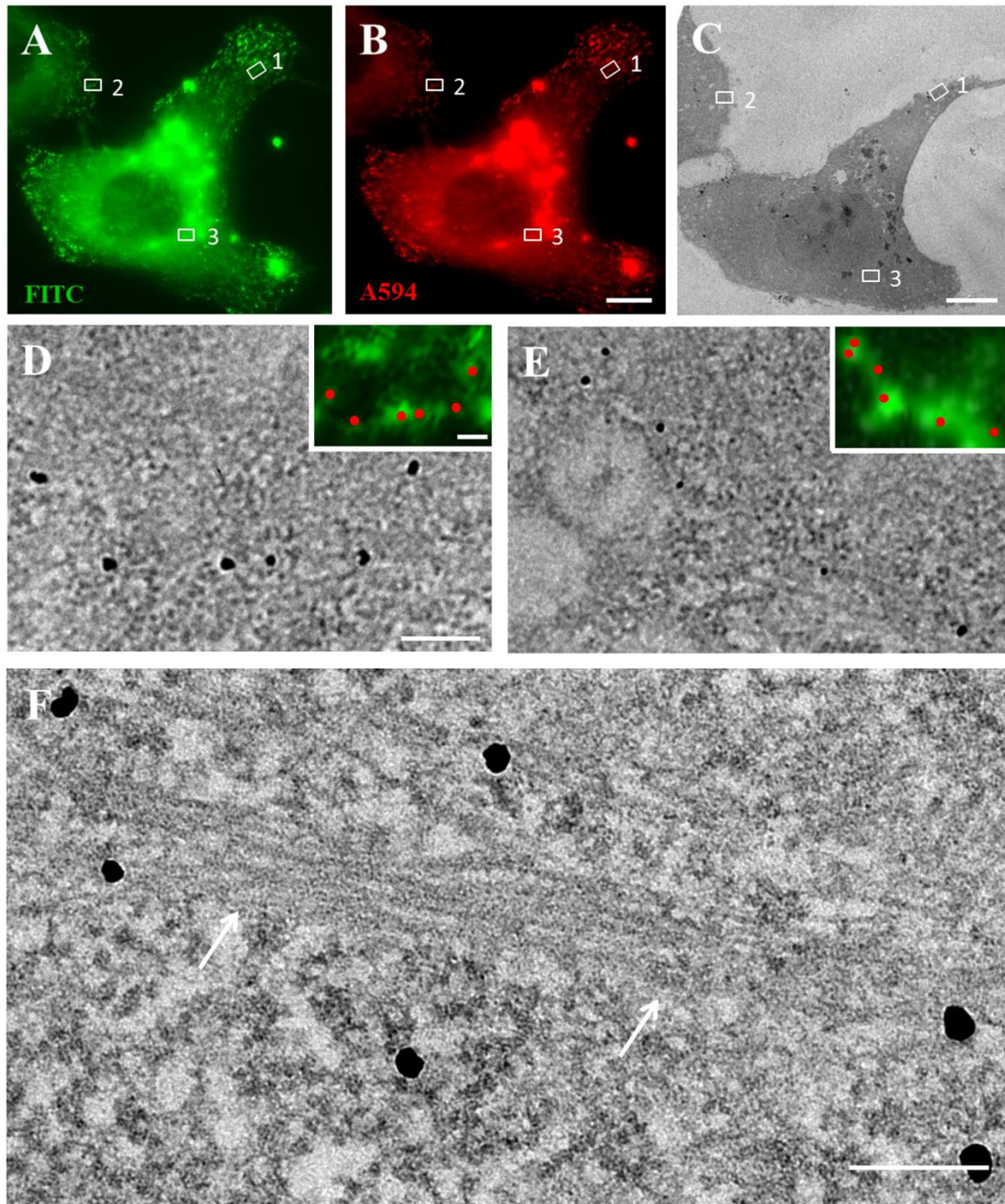
### 3. Distribution des anticorps par microscopie corrélative

Puisque la résolution et le contraste du FIB-SEM ne permettent pas la visualisation de filaments intermédiaires, nous avons utilisé une approche de microscopie corrélative pour obtenir des informations structurales sur la structure marquée par les anticorps anti-K8 délivrés. Cette technique consiste à observer une même cellule en microscopie à épifluorescence et en microscopie électronique à transmission pour situer spatialement avec une meilleure précision les molécules d'anticorps K8-FITC.

Par conséquent, après 4 heures d'incubation, les cellulesensemencées sur un support quadrillé, ont été fixées et immunomarquées avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à la fois au fluorophore AlexaFluor 594 et à une bille d'or de 1,4nm de diamètre (FNG-A594-Au) (Figure 52). En microscopie corrélative, le choix du fixateur est important afin d'avoir une bonne préservation morphologique en microscopie électronique sans gêner la reconnaissance des épitopes cellulaires pour l'immunomarquage. Nous avons testé différents fixateurs (paraformaldéhyde 4% à différents temps et solution de paraformaldéhyde/glutaraldéhyde à différentes concentrations). Notre choix s'est porté sur une solution à 4% de paraformaldéhyde et de 0,1% de glutaraldéhyde afin d'avoir une bonne accessibilité aux antigènes et une bonne préservation morphologique des structures cellulaires.

Après 4 heures d'incubation, sur une cellule sélectionnée, la délivrance d'anticorps anti-K8 par DOPRI a conduit à un marquage intense du cytosquelette cellulaire (Figure 52A).



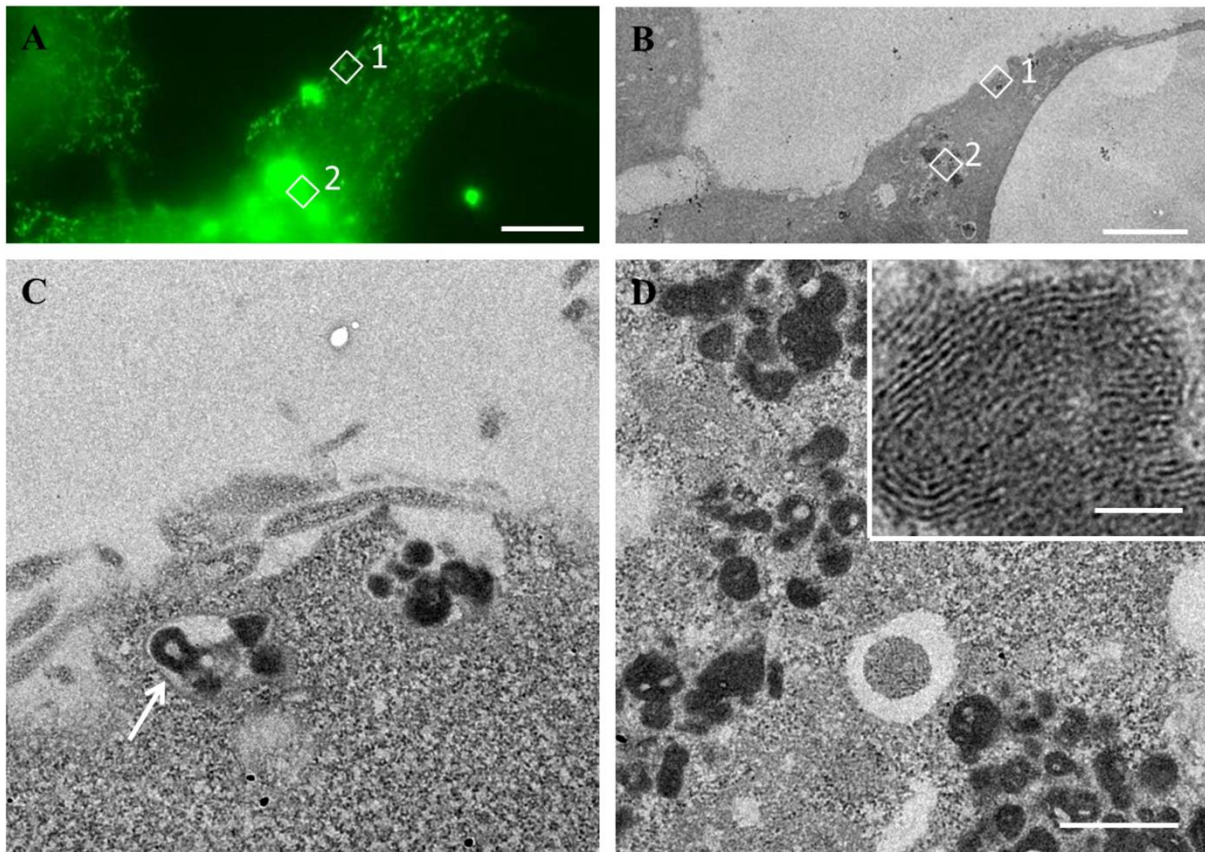


**Figure 52 : Visualisation de filaments décors par l'anti-K8 par microscopie corrélative.**

Pour visualiser la délivrance de l'anti-K8 sur les filaments, une même cellule a été observée à la fois en microscopie à fluorescence et en microscopie électronique à transmission en utilisant un anticorps secondaire couplé à des billes d'or et à l'AlexaFluor 594 (FNG-A594-Au) dirigé contre anti-K8. (A) Image fluorescente du FITC anti-K8 délivré dans une cellule. (B) Immunofluorescence d'anti-K8 en utilisant FNG-A594-Au. (C) Une section de MET de la même cellule. Cette section montre une section de cellule proche du support de culture. (D, E) Agrandissements correspondant aux deux ROI (carrés blancs 1 et 2 respectivement en A). (F) Images MET montrant des particules d'or de ROI 3 marqué en A. Des flèches blanches désignent un filament de 8nm de diamètre. Les barres d'échelle sont de 10µm dans (A-B), 400nm en (C), 200nm dans (D, E et insert) et 150nm dans (F).

Le signal AlexaFluor 594 co-localise avec le signal anti-K8, suggérant que le signal FNG-A594-Au est spécifique de l'anticorps anti-K8 (Figure 52A et 52B). Après amplification à l'argent des billes d'or, la cellule a été incluse dans de la résine et de fines sections ont été réalisées avec un ultramicrotome. Les observations MET des coupes cellulaires sont présentées sur les Figure 52C, 52E et 52F. La coupe de MET représentée sur la Figure 52C représente une vue d'ensemble de la cellule qui permet de localiser trois régions d'intérêt (ROI) définies sur les Figure 52A et 52B. A un fort grossissement, la distribution des particules d'or corrèle avec le signal fluorescent dans le ROI 1 et 2 (Figure 52D et 52E). Les particules d'or ont été marquées en rouge pour une meilleure visualisation (insert Figure 52D et 52E). Une image MET à fort grossissement de ROI 3 montre que les particules d'or sont réparties le long de filaments (Figure 52F). Ces filaments ont un diamètre d'environ 8 nm qui peut correspondre au diamètre attendu pour les filaments intermédiaires. Ces résultats indiquent fortement que les molécules anti-K8 ont été délivrées et sont liées à des protéines K8 assemblées en tant que filaments intermédiaires.

Sur une coupe de cellule en microscopie électronique à transmission, on peut noter également la présence de complexes DOPRI/anti-K8 dans la cellule ayant internalisé l'anticorps (Figure 53A-C). Deux ROI sont définis correspondant à des spots fluorescents intenses. Ces ROI 1 et 2 correspondent à des structures lipidiques multilamellaires en microscopie électronique (Figure 53C et 53D respectivement). Les complexes DOPRI/anti-K8 sont observés dans le cytoplasme de la cellule mais également dans les vésicules près de la membrane plasmique (flèche blanche Figure 53B). Les complexes retrouvés dans la cellule forment des structures multilamellaires concentriques en accord avec les observations de cryo-TEM et de coloration négative (insert Figure 53C). Ce résultat suggère que les complexes semblent se trouver dans des endosomes une fois internalisés par la cellule. Ces résultats tentent à montrer que l'internalisation des complexes emploierait un mécanisme d'endocytose.



**Figure 53 : Complexes DOPRI/anti-K8 dans les cellules HeLa**

Images d'une cellule ayant délivrés les anticorps en microscopie à fluorescence (A) et en microscopie électronique à transmission (B). (C-D) Fort grossissement de deux régions d'intérêts en MET (carrés blancs 1 et 2 correspondent aux images C et D respectivement). Les structures denses aux électrons correspondent à des vésicules multilamellaires (flèches blanches). Barre d'échelle : 1 $\mu$ m (A-B) 500nm (C-D) et insert : 50nm

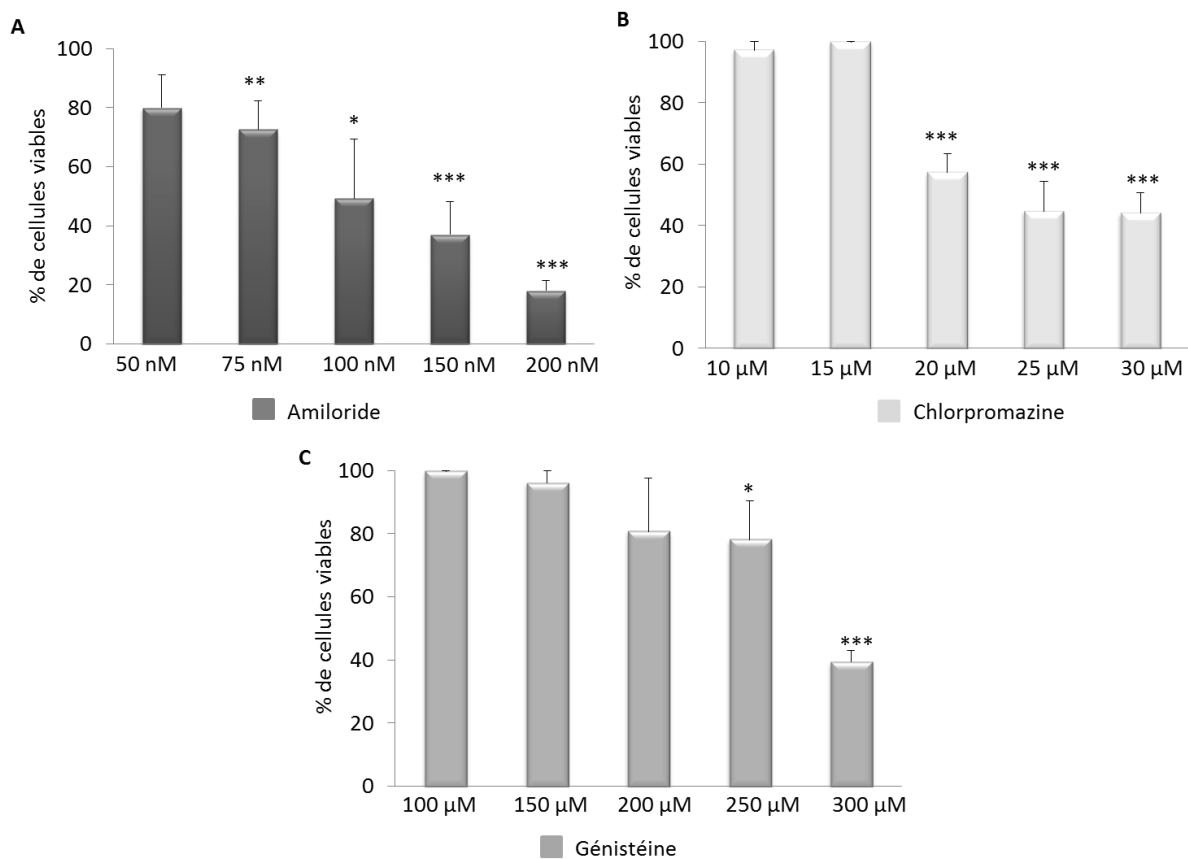
## D. Mécanisme d'internalisation et de délivrance

### 1. Voies d'endocytoses

Nous avons étudié les mécanismes d'internalisation des complexes DOPRI/anti-K8. Pour étudier les voies d'endocytose, on a utilisé des inhibiteurs chimiques classiques de l'endocytose, à savoir la chlorpromazine (inhibiteur de l'endocytose dépendant de la clathrine), la génistéine (inhibiteur de l'endocytose dépendante des cavéoles) ou l'amiloride (inhibiteur de macropinocytose). De plus, l'endocytose dépendante des cavéoles a été évaluée à l'aide d'un siRNA Cav-1.

Dans un premier temps, la concentration non toxique des inhibiteurs a été déterminée en utilisant un test de cytotoxicité cellulaire. Le test de viabilité cellulaire luminescent CelltiterGlo a été utilisé selon les recommandations du fabricant. La viabilité cellulaire a été

mesurée à différentes concentrations d'inhibiteurs (Figure 54A, 54B et 54C) basés sur la littérature.



**Figure 54 : Influence de la concentration des inhibiteurs sur la viabilité cellulaire.**

Les cellules ont reçu 800ng d'anticorps anti-cytokératine 8 complexés aux lipides cationiques DOPRI au rapport molaire 1500. Après 4 heures d'incubation en présence des inhibiteurs (génistéine, chlorpromazine et amiloride), les cellules ont été incubées avec le réactif du test de viabilité cellulaire.

Les conditions d'expérimentation (0,8μg de protéine à un ratio molaire de 1500) sont les mêmes que celles déterminées dans la précédente publication (Chatin et al., 2015). Dans ces conditions, il n'y a pas de toxicité notable ou d'effet sur la viabilité cellulaire. Une différence significative de la viabilité cellulaire a été observée à partir de 250 μM pour la génistéine (Figure 54A), de 20 μM pour la chlorpromazine (Figure 54B) et de 75 nM pour l'amiloride (Figure 54C).

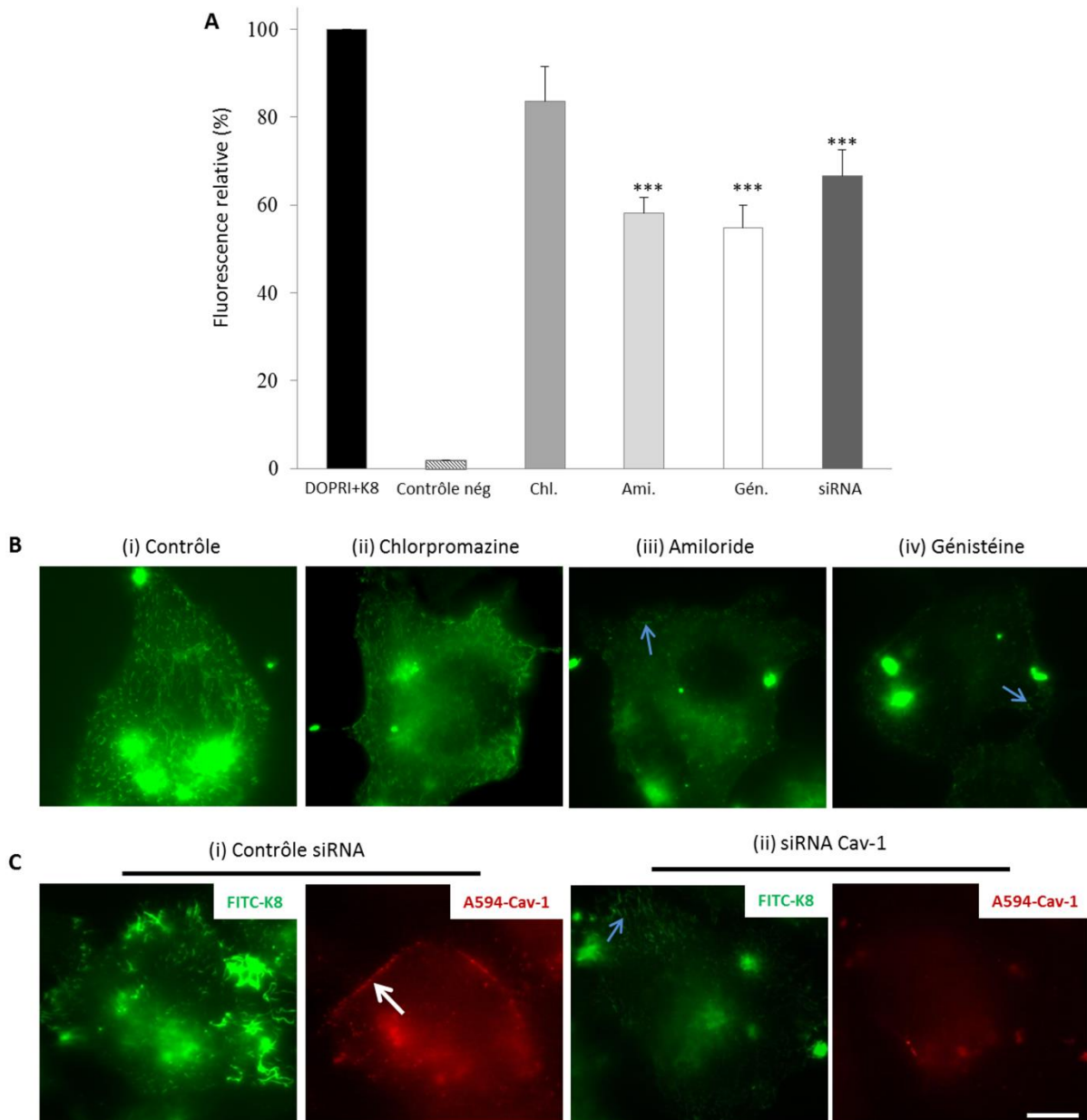
La concentration en inhibiteurs est choisie afin de limiter au maximum l'effet cytotoxique des inhibiteurs sur les cellules tout en maintenant une bonne inhibition de l'endocytose des marqueurs des voies (le dextran 70K pour la macropinocytose, la transferrine pour la voie clathrine et le bodipy-LacCer pour la voie cavéole) (Figure 59). L'ensemble des résultats nous



ont permis de déterminer les concentrations utilisées pour la suite des expérimentations. Pour les expériences de cytométrie en flux, la génistéine sera utilisée à 150 $\mu$ M, la chlorpromazine à 15 $\mu$ M et l'amiloride à 50nM.

Dans un deuxième temps, pour explorer les voies d'endocytoses impliquées dans l'internalisation des complexes lipides/protéines, les cellules ont été traitées avec les inhibiteurs des voies d'entrée pendant 4 heures ou avec des siRNA Cav-1. Ensuite, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (Figure 55A) ou par microscopie à fluorescence (Figure 55B et 55C).

Les données de cytométrie en flux (Figure 55A) montrent l'internalisation des complexes DOPRI/anti-K8 est significativement ( $p < 0,01$ ) réduite par le traitement à l'amiloride ou à la génistéine, respectivement de 42% et 45%, alors que le traitement à la chlorpromazine n'a pratiquement aucun effet (84%). De plus, afin d'approfondir la voie CvME, le gène Cav-1, codant la protéine principale responsable de la formation des cavéoles, a été éteint avec un siRNA Cav-1 spécifique. Les cellules ont été préalablement transfectées avec des siRNA Cav-1 puis l'anticorps anti-K8 a été délivré dans les cellules via DOPRI. Au préalable, l'efficacité de la transfection des siRNA Cav-1 a été visualisée par Western Blot (Figure 62 en Annexe) à deux temps différents (24 heures et 48 heures) afin d'optimiser le temps d'expression. On remarque une extinction du gène Cav-1 dès 24 heures. Nous nous sommes donc placés à 24 heures d'expression afin d'évaluer la quantité de fluorescence intracellulaire après extinction du gène Cav-1 par cytométrie en flux (Figure 55A). L'internalisation des complexes DOPRI/anti-K8 est diminuée de 33%, soutenant l'implication de la voie cavéolaire (significativement différent avec  $p < 0,01$ ). Cette inhibition n'est pas significativement différente ( $p = 0,17$ ) de l'inhibition observée avec l'inhibiteur chimique de la voie CvME. Les résultats de l'inhibition de la voie CvME par inhibiteur chimique ou par extinction de gènes concordent. Ces résultats montrent que l'internalisation cellulaire des complexes lipides/protéines se fait via la voie macropinocytose et la voie d'endocytose dépendante des cavéoles (CvME).



**Figure 55 : Voies d'internalisation impliquées dans le marquage des filaments par l'anti-K8.**

(A) Analyse par cytométrie en flux de l'internalisation des complexes DOPRI/anti-K8 dans des cellules traitées avec divers inhibiteurs chimiques (chlorpromazine (Chl.), amiloride (Ami.) et génistéine (Gén.)) et avec siARN Cav-1 empêchant l'endocytose. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de fluorescence de trois expériences représentatives  $\pm$  SD. (B-C) Images fluorescentes de cellules traitées avec ces inhibiteurs d'endocytose montrant une diminution du marquage des filaments. Pour les cellules siARN Cav-1, les cellules sélectionnées étaient négatives au marquage anti-Cav-1. Barre d'échelle: 10 $\mu$ m.

Afin de corrélérer l'implication de ces deux voies d'internalisation dans le marquage des filaments intermédiaires, les cellules soumises aux inhibiteurs chimiques et aux siRNA Cav-1 ont également été analysées par microscopie à fluorescence (Figure 55B et 55C). La majorité des cellules traitées à la chlorpromazine (environ 53% des cellules observées) présentent un marquage des filaments similaire à celui des cellules témoins (Figure 55B). Au contraire, les

traitements à l'amiloride ou à la génistéine réduisent nettement le nombre de cellules possédant un marquage des filaments intermédiaires (moins de 24% et 21% de cellules observées respectivement). De même, parmi les cellules siARN Cav-1 (correspondant à une absence de signal AlexaFluor 594), seules 16% des cellules observées montrent des filaments fluorescents renforçant le rôle de la voie des cavéoles dans la délivrance d'anti-K8 (Figure 55C). Au final, ces résultats indiquent que la macropinocytose et l'endocytose médiée par les cavéoles sont impliquées dans l'internalisation de l'anti-K8 via le lipide cationique DOPRI et dans le marquage des filaments intermédiaires avec une contribution majeure pour la voie cavéolaire.

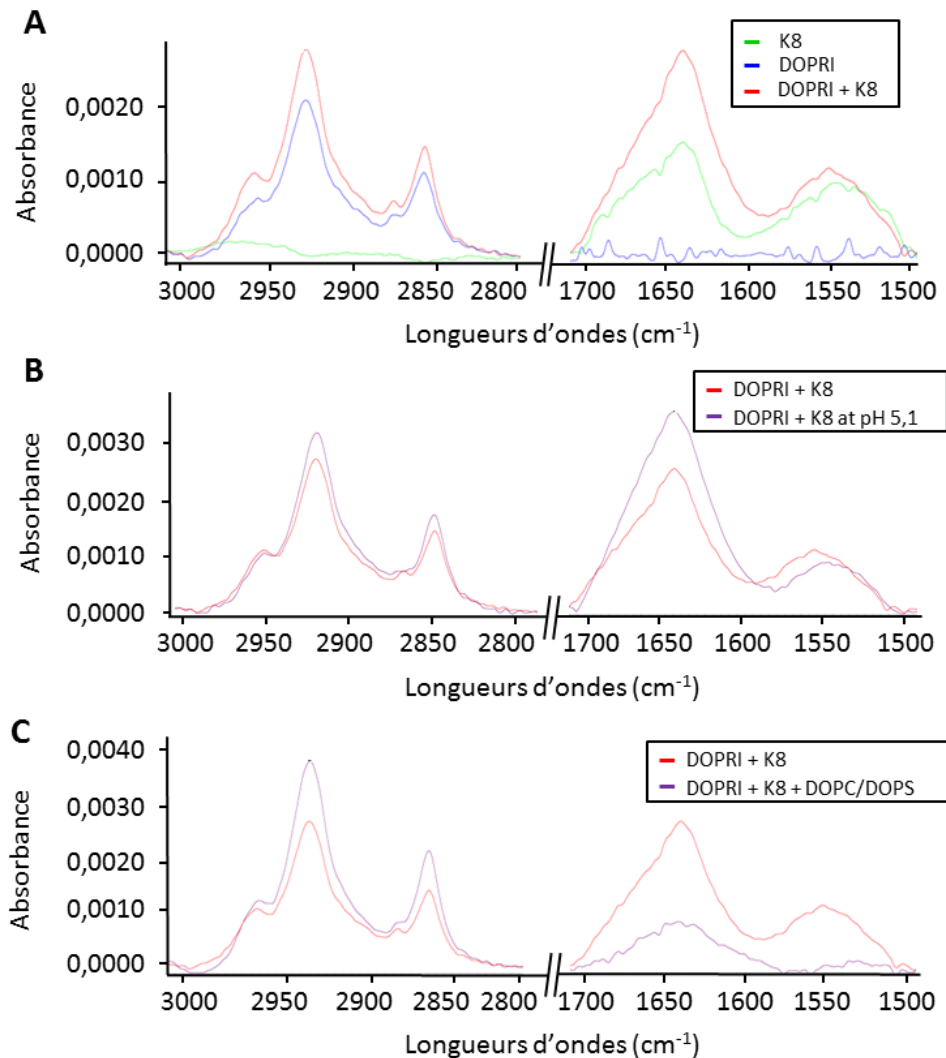
## 2. Echappement endosomal

Dans le but de comprendre le mécanisme d'échappement endosomal, des expériences de spectroscopie ATR-FTIR ont été testées. L'ATR-FTIR polarisée fournit des informations sur les structures secondaires des protéines et leur orientation par rapport à la membrane lipidique (Castano and Desbat, 2005), c'est donc une méthode appropriée pour obtenir plus de détails sur l'interaction de l'anti-K8 avec le lipide DOPRI. Le lipide cationique DOPRI a été déposé sur le cristal de germanium afin de former une bicouche supportée. Après enregistrement du spectre en polarisation P (Figure 56) et S (Figure 60 en annexe), l'anticorps anti-K8 a été ajouté et un nouveau spectre a été enregistré après rinçage. Dans le but d'identifier le ou les paramètres impliqués dans le détachement de l'anticorps aux lipides, l'effet du pH, d'une forte concentration en sels ou encore la présence de lipides anioniques ont été testés (Figure 56A-C).

La formation et l'organisation de la bicouche de DOPRI sur le cristal de germanium ont été observées par le rapport dichroïque ( $R_{ATR}$ ) de la bande  $\nu_{CH_2}$  à  $2853\text{ cm}^{-1}$  et l'absorbance des  $\nu_{CH_2}$  à  $2925\text{ cm}^{-1}$  respectivement (Figure 56A (spectre bleu)). Une seule bicouche lipidique supportée par DOPRI a été formée avec un certain désordre dans la chaîne. L'addition d'anti-K8 conduit à deux bandes d'absorption supplémentaires dans la région amide I et amide II ( $1700$  à  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) indiquant l'interaction entre la bicouche anti-K8 et DOPRI (Figure 56A (spectre rouge)). La position et le rapport dichroïque des bandes lipidiques ( $3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$ ) n'ont pas été affectés par cette adsorption. Ensuite, l'anti-K8 interagit principalement avec le groupe de tête lipidique sans insertion profonde dans la bicouche lipidique. La Figure 56A



(spectre vert) montre le spectre d'ATR-FTIR de l'anti-K8 séché. On peut observer une faible variation du profil des bandes amides, mais elle peut être due au processus de séchage. La large bande d'amide I observé sur la bicouche lipidique révèle la présence de nombreux éléments structuraux secondaires (feuilles bêta, hélices alphas).



**Figure 56 : Analyse ATR-FTIR représentant l'attachement de l'anticorps à la bicouche supportée DOPRI.**

(A) spectres polarisés en P de l'anti-K8 en solution, de la bicouche supportée par DOPRI sans et avec l'anti-K8. (B) Effet du pH 5,1 sur l'interaction de l'anti-K8 avec DOPRI. (C) Effet des liposomes anioniques DOPC/DOPS sur l'interaction de l'anti-K8 avec DOPRI induisant une libération partielle.

La libération d'anti-K8 a été évaluée en modifiant les conditions ioniques (pH et concentrations en sels) et en ajoutant des lipides anioniques. Aucun effet significatif sur la région des amides I et II n'est observé à pH 5,1 (Figure 56B) ou à pH 3 (Figure 61A en Annexe). On obtient un résultat similaire en présence d'une concentration de NaCl 1 M (Figure 61B en Annexe). Ainsi, le pH acide ou la concentration élevée en sels n'induisent pas

le détachement de molécules d'anti-K8 de la surface du DOPRI. Ceci indique que le complexe DOPRI/anti-K8 n'est pas dissocié par une variation de pH ou de force ionique qui peut se produire à l'étape de formulation ou à l'étape d'incubation avec les cellules. Nous avons donc émis l'hypothèse que la formation d'un couple lipides cationiques/lipides anioniques formé dans l'endosomes serait un moyen pour détacher l'anticorps des lipides cationiques. Dans un premier temps, nous nous sommes assuré que les lipides cationiques et anioniques pouvaient former une liaison (Figure 61C en Annexe). En effet, au niveau de  $3000\text{ cm}^{-1}$ , on observe une augmentation du pic. La quantité de lipides accrochée a doublé après ajout de lipides anioniques. Ces résultats suggèrent l'attachement des lipides anioniques à la bicouche supportée de lipides cationiques. Ensuite, de façon intéressante, l'addition de lipides anioniques (Figure 56C) déclenche une forte augmentation au niveau de  $1650\text{ cm}^{-1}$  suggérant la formation du couple de lipides cationiques/lipides anioniques. Plus important encore, une diminution dans la région amide I et II est observée suggérant la libération d'anti-K8. La liaison du lipide anionique au lipide DOPRI cationique entraînée par des interactions électrostatiques permet une libération partielle de molécules anti-K8. Ces résultats suggèrent que l'échappement endosomal pourrait être provoqué par un mécanisme de « flip-flop ».

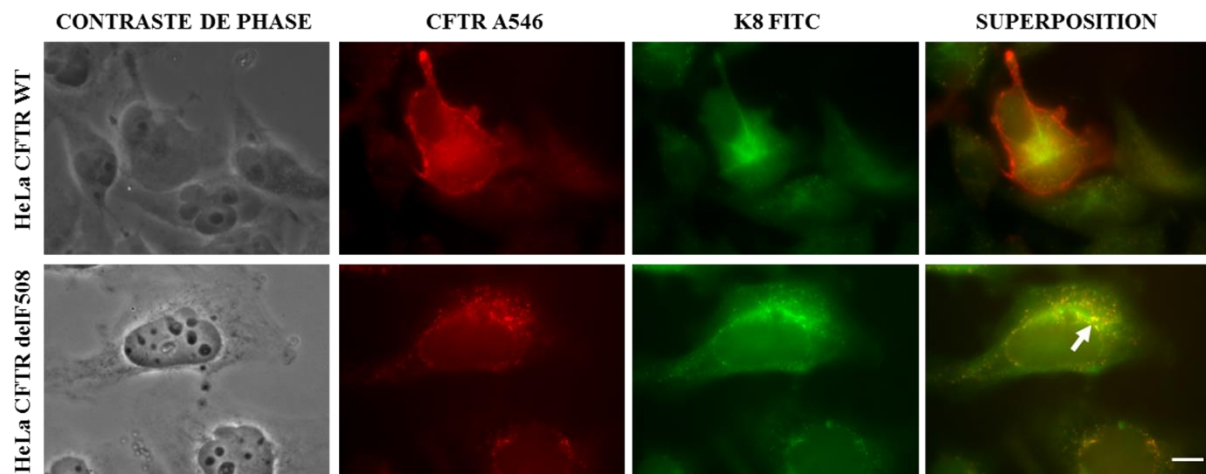
## E. Application thérapeutique

Afin d'étudier la délivrance d'une protéine thérapeutique via le lipide cationique DOPRI, l'anticorps anti-K8 a été utilisé. Cette protéine est impliquée dans la relocalisation du CFTR à la membrane plasmique (Edelman, 2014). En effet, il a été démontré que la protéine K8 était liée directement au CFTR muté (F508del) *in vivo* provoquant la rétention du canal dans le réticulum endoplasmique et son absence à la membrane plasmique. L'inhibition de l'expression de K8 par des molécules pharmacologiques ou siRNA dans des cellules HeLa exprimant CFTR-F508del a conduit à la récupération de l'efflux d'iodure dépendant du CFTR (Colas et al., 2012). D'après ces résultats et ceux de l'étude précédente, l'anticorps anti-K8 a été délivré dans des cellules HeLa exprimant le CFTR sauvage « Wild Type » ou exprimant le CFTR muté en position 508 « delF508 » en utilisant le lipide cationique DOPRI.

### 1. Colocalisation du CFTR et de K8

Les cellules HeLa exprimant le CFTR WT ou delF508 proviennent de l'équipe d'Aleksander Edelman (Institut Necker des Enfants Malades, Paris). Après remise en culture, afin d'avoir un nombre suffisant de cellules, un immunomarquage a été réalisé afin de vérifier l'expression du CFTR au sein de ces cellules. La Figure 57 montre les images de microscopie à épifluorescence obtenues. Dans les cellules HeLa exprimant le CFTR WT, la protéine CFTR est localisée au niveau de la membrane plasmique. En revanche, au sein des cellules HeLa exprimant le CFTR muté, la protéine se trouve autour du noyau. Le marquage périnucléaire est caractéristique d'une localisation au niveau du réticulum endoplasmique. Ces résultats sont en accord avec la littérature décrivant la localisation de la protéine CFTR au sein des cellules comme observées (Colas et al., 2012).

Dans un deuxième temps, la colocalisation de la protéine CFTR avec la protéine K8 a été mise en évidence (Figure 57).



**Figure 57 : Double immunomarquage de la protéine CFTR et K8 sur les cellules HeLa exprimant le CFTR WT ou le CFTR delF508.**

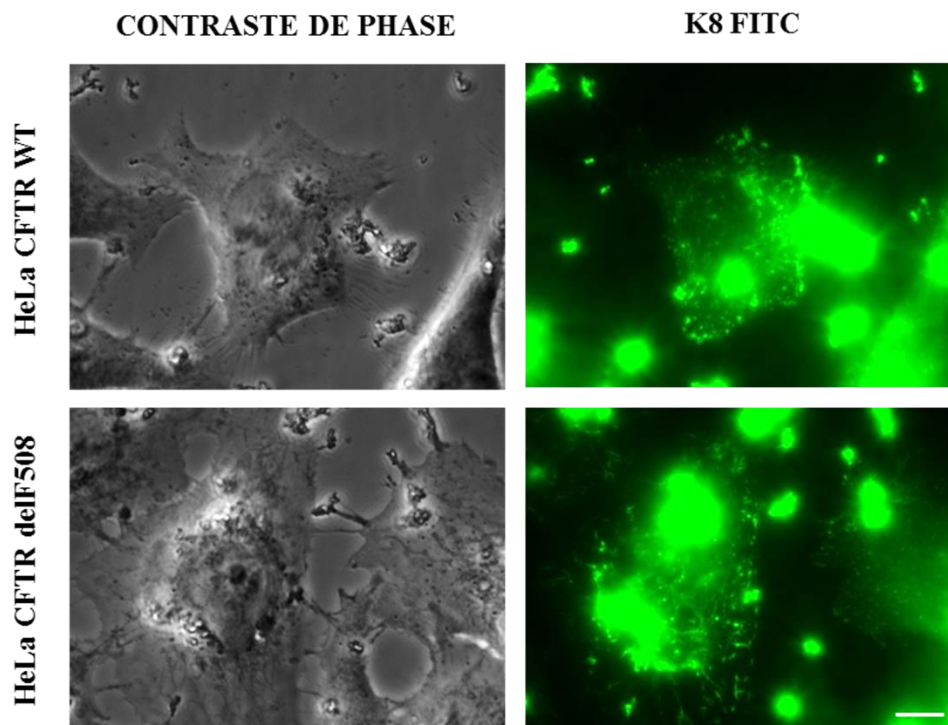
Les cellules ont été fixées puis un immunomarquage de K8 et de CFTR a été réalisé sur les cellules HeLa exprimant le CFTR WT ou delF508. Les cellules ont ensuite été observées en microscopie à épifluorescence. Barre d'échelle : 10µm

Au sein de cellules HeLa CFTR WT, on observe la présence de la protéine CFTR au niveau de la membrane plasmique. Par contre, la protéine K8 se trouve sous la forme d'un réseau sous-membranaire et périnucléaire. Au sein de ces cellules, les deux protéines ne colocalisent. En revanche, au sein des cellules HeLa CFTR muté, la protéine CFTR se trouve au niveau du réticulum endoplasmique (autour du noyau). Dans ces cellules, les deux protéines

colocalisent partiellement. Ces résultats montrant la colocalisation partielle des protéines K8 et CFTR au sein des cellules HeLa CFTR muté sont en accord avec des précédentes études. En effet, Colas et al., 2012 ont déjà caractérisé ces types cellulaires en montrant la localisation de ces deux protéines.

## 2. Délivrance de K8 via DOPRI et marquage du CFTR

Afin d'étudier la faisabilité de délivrer l'anticorps anti-K8 au sein de cellules HeLa CFTR delF508 ou CFTR WT avec le lipide cationique DOPRI, des expériences de microscopie à épifluorescence ont été effectués. Les cellules HeLa ont été incubées avec les complexes DOPRI/anti-K8 pendant 4 heures, fixées et observées au microscope à épifluorescence (Figure 58).



**Figure 58 : Délivrance de l'anticorps anti-K8 via DOPRI sur des cellules HeLa exprimant le CFTR WT ou le CFTR delF508.**

Les cellules ont été incubées avec les complexes pendant 4 heures, fixées et observées en microscopie à épifluorescence. Barre d'échelle : 10µm

Que ce soit au sein des cellules HeLa CFTR WT ou des cellules HeLa CFTR muté, les cellules présentent un fort marquage des filaments intermédiaires suggérant l'internalisation et la délivrance de l'anticorps. Ces résultats montrent la faisabilité de la transfection protéique sur des cellules HeLa modifiées.









## **Discussion & Perspectives**



## **Discussion & Perspectives**

Les résultats obtenus durant ces 3 années thèses nous ont permis d'identifier les relations qui existent entre les caractéristiques physico-chimiques des vecteurs et leur capacité à délivrer efficacement les macromolécules biologiques au sein des cellules. Pour y parvenir, nous avons mis en œuvre le développement d'un système lipoaminoglycoside optimal permettant la délivrance intracellulaire efficace de molécules biologiques et notamment de protéines. Les macromolécules biologiques ont été délivrées soit par l'association de deux lipides (lipide cationique + colipide) définis comme étant un système lipoaminoglycoside double, soit par un lipide cationique c'est-à-dire un système lipoaminoglycoside simple.

Ces travaux se sont axés sur deux points : les vecteurs pour la délivrance intracellulaire de tout type d'acides nucléiques (ADN, ARNm, siRNA) et les systèmes de délivrance protéiques.

### **Délivrance d'acides nucléiques**

Les lipides cationiques constituent aujourd'hui une catégorie des vecteurs efficaces pour la délivrance des acides nucléiques. Fortement étudiés depuis de nombreuses années, leurs propriétés n'ont pas cessé d'être améliorées en prenant en compte les différents constituants afin d'obtenir un haut niveau de transfection avec une toxicité minimale. Ces études se sont portées sur l'utilisation de lipides cationiques dérivés d'aminoglycosides (paromomycine, néomycine, kanamycine et tobramycine), famille de vecteur fortement efficace pour la délivrance d'acides nucléiques (Belmont et al., 2002; Habrant et al., 2016; Sainlos et al., 2003). Les études réalisées sur la délivrance de trois molécules différentes d'acides nucléiques ont permis de décrire les propriétés des dérivés des aminoglycosides et suggérer leur mécanisme d'action.

### **Longueur de la chaîne hydrophobe**

Nous avons pu mettre en évidence que la longueur de la chaîne hydrophobe avait un impact sur l'efficacité de transfection. En effet, on a pu observer que les modifications de la longueur des chaînes acyles ont conduit à des effets nuisibles par rapport à la chaîne

dioléique présente dans **DOSP**. On peut donc conclure que des chaînes saturées et/ou plus courtes que les chaînes à 18 carbones (C18) sont moins efficaces pour la délivrance d'acides nucléiques. En effet, en 2010, Zhi et al., ont observé qu'une chaîne aliphatique courte et/ou portant des saturations est moins efficace pour la délivrance d'acides nucléiques qu'une chaîne aliphatique portant 18 carbones. Dans une autre étude, il a également été montré que la longueur de la chaîne hydrophobe ainsi que les saturations présentes avaient un impact sur l'efficacité de transfection (Felgner et al., 1994; Zhi et al., 2010). Les différentes formulations lipidiques avec des chaînes aliphatiques de longueurs variables présentaient une transfection plus ou moins efficaces. L'analogue avec un acyle composé d'une chaîne saturée était progressivement plus actif que les analogues ayant des insaturations. Ces expériences sur le domaine hydrophobe ont conduit aux mêmes résultats que décrits dans des études précédentes et pourrait être attribués à des conditions moins favorables pour l'échappement endosomal.

### **Nature du bras espaceur**

Dans ces études, nous avons pu montrer que la nature du bras espaceur avait une forte influence sur l'efficacité de transfection. **DOSST**, le lipide cationique qui présente une très haute efficacité de transfection, possèdent une liaison ester au niveau du bras espaceur. La conception de ce lipide est basée sur des résultats de la littérature avec le lipide ionisable DOTAP. En effet, le lipide DOTAP, qui contient des fonctions ester dans le bras espaceur et deux chaînes oléiques en tant que partie hydrophobe, a montré un rendement de transfection plus élevé et une toxicité réduite par rapport au lipide DOTMA, son analogue portant des fonctions éther (Behr, 1994; Leventis and Silviu, 1990). Le mécanisme pour la délivrance intracellulaire des acides nucléiques est composé de plusieurs étapes et les étapes d'échappement endosomal sont influencées par les propriétés des lipides (Hafez et al., 2001; Xu and Szoka, 1996). La présence de la liaison ester dans le bras espaceur peut être responsable d'une meilleure interaction avec les phospholipides anioniques. La conséquence de cette interaction serait la formation de nouvelles bicouches obtenues à partir de l'association des lipides anioniques de la membrane et des lipides cationiques du lipoplexe. Les résultats tendent à suggérer que ces interactions sont capables de promouvoir une libération efficace d'ARNm, d'ADN ou de siRNA.

En revanche, le lipide **DOAT** avec une fonction disulfure au niveau du bras espaceur, a donné des résultats négatifs avec tous les types d'acides nucléiques sous forme de lipoamynoglycoside simple. Des études antérieures ont démontré que l'introduction d'un pont disulfure dans la structure d'un lipide ionisable peut conduire à la réduction du lipide dans le compartiment intracellulaire, provoquant la déstabilisation du complexe et la libération de l'ADN dans le cytosol. Cependant, cette libération efficace par rapport aux molécules non réductibles n'était pas nécessairement associée à une efficacité de transfection élevée avec des lipoaminoglycosides simples et l'effet était plus prononcé avec des lipoaminoglycosides doubles (Lv et al., 2006; Martin et al., 2005; Shirazi et al., 2011; Tang and Hughes, 1998; Wetzter et al., 2001). L'inefficacité de **DOAT** peut s'expliquer par le fait que la réduction du pont disulfure peut se produire dans le compartiment endosomique, conduisant à la séparation du groupe de tête tobramycine et de la queue lipophile. Ceci semble nuire au mécanisme de mélange des lipides car les interactions sont nécessaires pour déclencher la rupture de la membrane endosomale. Avec **DOAT**, les acides nucléiques piégés dans l'endosome ne sont donc pas libérés dans le cytoplasme et sont dégradés par fusion avec des lysosomes. En effet, nous avons pu démontrer que **DOAT** se complexer de la même façon que le composé efficace mais une libération des molécules d'ADN a été observée en présence d'agents réducteurs.

Pour confirmer le mécanisme d'action (mécanisme de « flip-flop »), **DOAT** a été utilisé dans une formulation avec le colipide fusogène neutre **DOPE**, qui induit un autre mécanisme d'échappement endosomal. La formulation **DOAT : DOPE** s'est révélée efficace pour la délivrance intracellulaire d'ADN plasmidique, tandis que **DOAT** seul ne permet pas la transfection des molécules d'ADN. Le mécanisme qui se déroule en présence du colipide est différent puisque le colipide **DOPE** est connu pour conduire à une fusion et une déstabilisation de la membrane à pH réduit (Khalil et al., 2006). Dans ce cas, l'inefficacité du mécanisme de mélange des lipides peut être contrebalancée par l'addition d'un colipide neutre capable d'induire un mécanisme de fusion alternatif pour la rupture de la membrane endosomale. Ces résultats ont démontré que l'échappement endosomal est une étape clé pour la délivrance efficace d'acides nucléiques lorsqu'on utilise un lipoamynoglycoside simple. La formulation d'un système de délivrance avec un colipide neutre conduit habituellement à une plus grande puissance de transfection par rapport à la forme lipidique

simple, mais augmente la complexité de la formulation. Les résultats ont démontré que **DOSST** pouvait atteindre le même niveau de transfection que les liposomes **DOSST : DOPE**. Ces résultats suggèrent que les deux mécanismes (mélange de lipides et fusion avec les liposomes) sont bien distincts car aucun effet synergique n'a été observé avec **DOSST**. Nous avons supposé que la faible efficacité observée habituellement avec la forme lipidique simple était compensée par le mécanisme de mélange de lipides. Cette propriété est particulièrement intéressante pour le développement d'un système de délivrance simple (lipoaminoglycoside simple).

L'analyse par cryoTEM d'ARNm, d'ADN et de siARN avec **DOSST** a conduit à des complexes avec de petites caractéristiques globulaires (20-40 nm). En général, les complexes formés avec **DOSST** se sont avérés être plutôt petits, en particulier dans le cas de l'ARNm où des complexes de 70 nm ont été observés. Les caractéristiques observés de **DOSST** pour la délivrance d'ARNm pourraient également être associés à ces petits complexes, car les études indiquent que la voie d'endocytose dépend de la taille des particules (Billiet et al., 2012; Ma et al., 2007; Rejman et al., 2004; Wasungu and Hoekstra, 2006). En particulier, Hoekstra et al., en 2007, décrit que pour les complexes avec des tailles inférieures à 200 nm, la voie d'entrée est la voie clathrine-dépendent. Nous avons émis l'hypothèse que les complexes **DOSST/ARNm** pouvaient induire une endocytose médiée par la voie clathrine mais d'autres études seront nécessaires pour bien comprendre l'influence des lipides ionisables sur la taille des complexes et donc sur les mécanismes d'endocytose.

### **Liposomes homogènes vs liposomes hybrides**

Les lipides cationiques associés aux colipides forment des liposomes avec un bras espaceur de même nature (phosphoramide P ou amine N) ou de nature différente (phosphoramide P et amine N) conduisant à la formation de liposomes homogènes ou de liposomes hybrides respectivement. Nous nous sommes intéressés à l'association des lipides cationiques et des colipides conduisant à des liposomes homogènes (**CLN : HLN** ou **CLP : HLP**) ou à des liposomes hybrides (**CLN : HLP** ou **CLP : HLN**).

Ces associations ont différentes morphologies induisant différentes propriétés. Nous avons pu démontrer que la similitude ou non de la nature des bras espaceurs dans les lipides cationiques et colipides avaient un impact sur l'organisation des lipoplexes. Les résultats

d'efficacité de transfection sur des lignées cellulaires et sur des cultures de cellules primaires soulignent l'importance du bras espaceur de la structure du squelette du colipide, qui a une incidence directe sur l'activité de transfection. Les liposomes **hybrides** ont présenté une forte efficacité de transfection comparé aux liposomes homogènes pour tous les acides nucléiques. De plus, pour l'ARNm, la tendance était en faveur de **CLP : HLN** pour une meilleure transfection, ce qui indique que ce liposome peut fournir une orientation spatiale plus favorable que pour **CLN : HLP**. L'utilisation de liposomes **hybrides** est un facteur clé dans l'efficacité de transfection *in vitro*.

La morphologie des complexes étaient fortement affectée par la présence de liaisons hybrides ou homogènes entre les deux chaînes oléiques. Les différences d'organisation entre les lipoplexes homogènes et hybrides observés par cryoTEM dans les milieux DMEM indiquent une différence cruciale à la surface du lipoplexe. Les structures **hybrides** ont révélé des empilements de couches lipidiques séparés par des brins d'ADN, montrant que les molécules d'ADN étaient étroitement liées à la membrane lipidique comme décrits pour les lipoplexes (Pitard et al., 1999). Toutes les molécules d'acides nucléiques étaient fortement liées aux liposomes cationiques et piégées à l'intérieur des complexes. La couche de membrane externe de ces complexes était lipidique ayant la capacité d'interagir avec les composants membranaires. La structure des liposomes **hybrides** était donc plus appropriée pour l'internalisation dans des cellules. En revanche, les assemblages **homogènes** ont montré des empilements de couches de lipides et d'ADN à peine visibles et des liposomes intacts étaient présents, suggérant que les molécules d'ADN étaient faiblement liées aux liposomes. L'organisation concentrique multilamellaire obtenue avec les liposomes homogènes **CLN : HLN** et **CLP : HLP** a clairement montré une couronne externe avec des molécules d'ADN chargées négativement empêchant les interactions avec les membranes cellulaires. De plus, cet ADN situé à l'extérieur des assemblages homogènes est en contact direct avec l'environnement et est donc sujet aux dégradations. En conséquence, un nombre réduit de molécules d'ADN peut encore être efficace pour pénétrer dans les cellules. La structure de ces complexes ne semblait pas être optimale pour une entrée cellulaire efficace. Ceci indique fortement que le bras espaceur joue un rôle critique dans la morphologie des complexes d'ADN.



Il est connu que l'organisation morphologique des lipides cationiques ou liposomes peut avoir un impact dans les différentes étapes du procédé de transfection. En particulier, il a démontré dans une étude précédente que l'échappement endosomal dépendait fortement de la nature des lipides cationiques (Le Bihan et al., 2011). Le mécanisme de mélange des lipides repose sur les interactions entre les groupes de tête chargés positivement des lipides cationiques et les phospholipides anioniques de la membrane endosomale (Hafez et al., 2001; Xu and Szoka, 1996). En effet, ces interactions conduisent à la formation de nouvelles structures lipidiques multilamellaires neutres provoquant la rupture de la membrane endosomale et la libération des acides nucléiques dans le cytosol. Dans notre cas, les différentes combinaisons **CLN : HLN**, **CLP : HLP**, **CLN : HLP** et **CLP : HLN** ont toutes été préparées à partir du même aminoglycoside (paromomycine) et ont donc probablement induit un mécanisme d'échappement endosomal similaire. Les différences de transfection observées entre les systèmes homogènes (**CLN : HLN**, **CLP : HLP**) et hybrides (**CLN : HLP**, **CLP : HLN**) ne proviennent donc probablement pas du comportement différent dans le compartiment intracellulaire. Les assemblages **hybrides** semblaient être appropriés pour protéger les molécules d'acides nucléiques par une forte liaison aux liposomes cationiques. La morphologie de ces membranes liposomales hybrides (**CLN : HLP**, **CLP : HLN**) permet d'améliorer les interactions électrostatiques avec l'ADN (ARNm et siARN) qui induit une meilleure internalisation et donc une meilleure transfection. Ces liposomes hybrides se sont assemblés en couches concentriques dans des milieux DMEM, indiquant que l'architecture des complexes est dictée par l'environnement externe. Pour les liposomes hybrides (**CLN : HLP** ou **CLP : HLN**), l'ADN était fortement lié aux complexes et les milieux de complexation n'avaient qu'un faible impact. La propriété principale qui confère la stabilité de l'ADN repose sur des interactions électrostatiques entre le groupe de tête chargé positivement du lipide cationique et les fractions de phosphate chargées négativement des molécules d'ADN. Les complexes hybrides **CLN : HLP** et **CLP : HLN** apparaissant clairement plus adaptés pour la liaison aux molécules d'acides nucléiques que les complexes homogènes **CLN : HLN** et **CLP : HLP**.

**Conclusion :** Nous avons pu démontrer que les constituants des lipides cationiques jouent un rôle crucial dans l'efficacité de transfection. Que ce soit la longueur de la chaîne hydrophobe, la nature du bras espaceur ou encore la combinaison avec le colipide, ces

propriétés ont un impact sur la délivrance intracellulaire de tout type d'acides nucléiques. De plus, l'analyse morphologique des complexes par microscopie électronique a permis de souligner que l'organisation de la bicouche lipidique dans les lipoplexes est cruciale pour l'efficacité de délivrance des acides nucléiques, en influençant la forte liaison entre les acides nucléiques et le système de délivrance. Les systèmes formant de petites particules représentent un candidat très prometteur pour un développement ultérieur, en particulier dans le domaine innovant de la thérapie à base d'ARNm. Les études sur la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques ont permis d'identifier DOSP/MM27 comme étant la combinaison optimale à utiliser pour une transfection *in vitro* efficace. Le mécanisme d'action de ces complexes hybrides est probablement lié à la morphologie des complexes où les molécules d'acides nucléiques sont densément compactés et résistants à la décomplexation dans des conditions extracellulaires et endosomales.

#### Délivrance intracellulaire protéique

Ces études sur la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques nous ont amené à comprendre les propriétés de la formulation d'un vecteur optimal pour la délivrance de protéines.

#### **Lipoaminoglycoside double**

Le vecteur optimal DOSP/MM27 identifié pour la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques a été utilisé pour la délivrance intracellulaire de protéines thérapeutiques. En revanche, le composé **DOSP** seul ne permet pas la délivrance efficace de protéines comparée à l'ADN et siRNA (Desigaux et al., 2007; Mével et al., 2012; Vigneron et al., 1996). Il a donc été formulé avec deux colipides différents DOPE et MM27. Le colipide DOPE est souvent utilisé (Bartreau et al., 2008; Zuhorn and Hoekstra, 2002) et son mécanisme d'action est connu. Afin de libérer son contenu des endosomes après endocytose, la membrane endosomale est déstabilisée. La combinaison avec **DOPE** promeut la délivrance de l'enzyme avant la fusion de l'endosome avec les lysosomes pour la dégradation. En revanche, l'autre colipide, MM27, est connu pour avoir amélioré l'efficacité de transfection de 100 fois par rapport à **DOPE** (Billiet et al., 2012; Mével et al., 2012). Ce colipide comportant un groupement imidazole utiliserait le mécanisme d'éponge à protons afin de libérer son contenu des endosomes (Midoux et al., 2009). Nous avons pu démontrer que le complexe

**DOSP : MM27** permettait la délivrance de l'anticorps anti-K8 avec une efficacité de 70% comparée aux autres formulations lipidiques. En présence de l'anticorps, **DOSP : MM27** forme une organisation structurale unique, des vésicules multilamellaires concentriques portant la protéine à la surface. Ce système a déjà été décrit pour les acides nucléiques (Pitard et al., 1999). Cet arrangement suggère que le mécanisme d'éponge à protons est utilisé pour l'échappement endosomal dû à la présence de **MM27** qui prévient de l'acidification des vésicules d'endocytoses. Cela nous a permis de délivrer une protéine thérapeutique dans des cellules porteuses de la mutation delF508. La délivrance de la protéine dans ces cellules a permis la restauration partielle de l'activité du canal CFTR.

### **Lipoaminoglycoside simple**

Dans une étude précédente, il a été démontré que l'échappement endosomal est une étape clé pour la délivrance efficace d'acides nucléiques notamment lors de l'utilisation d'un lipoaminoglycoside simple (Habrant et al., 2016). Habituellement, la formulation d'un système de délivrance synthétique conjugué avec un colipide neutre (par exemple : DOPE) conduit à une plus grande efficacité de transfection par rapport au lipoaminoglycoside simple, mais augmente la complexité de la formulation. Les résultats ont démontré que le lipide DOSST était capable d'atteindre la même capacité de transfection que le lipoaminoglycoside double. Ces résultats sont particulièrement intéressants pour le développement d'un système de délivrance simple. Suite à ces résultats et aux résultats de la délivrance de protéines via un lipoaminoglycoside double, nous nous sommes intéressés à identifier un lipoaminoglycoside simple ayant la capacité de délivrer une protéine au sein de cellules vivantes et d'en comprendre son mécanisme d'action. Les formulations lipidiques simples dérivées d'aminoglycosides déjà décrites dans la littérature permettant la délivrance d'acides nucléiques ne sont pas des bons candidats pour la délivrance de protéine. Dans cette étude, nous avons développé un nouveau système de vecteur : un dérivé d'aminoglycoside : la ribostamycine. Nous avons pu observer que ce système de délivrance permettait, de la même façon que le système complexe (DOSP : MM27), la délivrance de protéine active et fonctionnelle.

Les complexes lipides/protéines ont été caractérisés en microscopie électronique à transmission et en cryo-MET dans des milieux de complexation différents. Les structures très

organisées et condensées montrent l'importance morphologique de la formulation lipidique. De plus, la différence morphologique entre les milieux de complexation indique l'importance du milieu de formulation pour l'internalisation et la délivrance de macromolécules. En effet, il a été démontré que l'organisation structurale des complexes étaient influencée par le milieu de complexation (Colombani et al., 2017). Les observations de cryo-microscopie électronique nous permettent de comprendre quelle est la meilleure organisation et structuration des complexes pour avoir une efficacité de transfection importante. Ce lipide cationique forme des organisations plus ou moins structurées selon le milieu de complexation. Dans le milieu optiMEM, les complexes présentent des arrangements sphériques multilamellaires. Cette organisation dite « en oignon » a déjà été décrite dans l'étude précédente (Chatin et al., 2015) pour la délivrance de protéine dans des cellules vivantes. Il semblerait que ces structures soient des organisations optimales pour induire l'internalisation et la délivrance de la protéine. Ces résultats suggèrent que le milieu de complexation optiMEM est le plus adapté pour la délivrance de la protéine dans les cellules vivantes. Comme pour les acides nucléiques, la différence morphologie en présence de protéine pourrait suggérer une transfection plus ou moins efficace et donc un mécanisme d'action différent. Les structures les plus organisées seraient favorables pour condenser les protéines et seraient plus efficaces pour délivrer l'anticorps dans des cellules vivantes.

Dans cette étude, nous démontrons la capacité de DOPRI à délivrer des anticorps dans le cytosol de cellules en culture et nous étudions le mécanisme de délivrance. DOPRI a permis de délivrer les anticorps anti-K8 aux filaments intermédiaires. En microscopie de fluorescence, on observe un marquage intense des filaments caractéristique du cytosquelette. De plus, une approche de microscopie corrélative a été réalisée avec un immunomarquage avec des billes d'or afin de visualiser les anticorps dans la cellule. En microscopie corrélative, les particules d'or sont observées dans une région d'intérêt correspondant à une section de la cellule proche du support. Dans cette région, on observe des fibres de 10 nm de diamètre, décorées de particules d'or. Dans la littérature, les filaments intermédiaires sont des fibres de protéines cytoplasmiques d'un diamètre de 8 à 10 nm et localisés sous une membrane plasmique et perinucléaires (Block et al., 2015; Fuchs and Weber, 1994; Herrmann et al., 2007). De plus, des images de FIB-SEM montrent que la majorité des particules d'or sont localisées près de la membrane cellulaire. Le niveau de la

section ainsi que la taille de la fibre observés en microscopie corrélative démontrent que les anticorps sont liés sur leurs cibles: les filaments intermédiaires.

Des images de microscopie corrélative révèlent la présence de lipide cationique dans des vésicules suggérant l'implication de l'endocytose comme mécanisme d'internalisation. Il est établi que la taille des particules détermine la voie d'endocytose utilisée (Benmerah and Lamaze, 2007; Kou et al., 2013; Zhang et al., 2009). La macropinocytose est basée sur le repliement de la membrane plasmique via l'actine (Gottlieb et al., 1993) formant de grandes vésicules, les macropinosomes. Ces macropinosomes se distinguent en particulier des autres types de vésicules endocytaires par leur grande taille (moins de 0,2 micron en moyenne mais jusqu'à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre (Hewlett et al., 1994) et leur absence de revêtement à leur surface. Les grosses particules ( $> 1 \mu\text{m}$ ) sont internalisées par les cellules via la macropinocytose. Par contre, les caveoles sont des invaginations de la membrane plasmique formant une vésicule recouverte de protéines spécifiques (Parton et al., 2006). Ce sont des micro-domaines qui se distinguent morphologiquement de la membrane plasmique par leurs tailles de l'ordre de 60 à 80 nm de diamètre, leurs formes en oméga et leurs structures (Parton and Simons, 2007). Les particules jusqu'à 100 nm sont de préférence et presque exclusivement endocytées via les cavéoles. Pour confirmer que les anticorps sont délivrés dans le cytosol par endocytose, des inhibiteurs des voies d'endocytose sont utilisés. Les données de cytomètre en flux ont démontré que l'efficacité de l'internalisation cellulaire était significativement réduite ( $p < 0,01$ ) en présence de l'inhibiteur des cavéoles (la génistéine) ou l'inhibiteur de la macropinocytose (l'amiloride). En revanche, la chlorpromazine, inhibiteur de la voie clathrine, n'a pas affecté l'internalisation des complexes. D'autres preuves suggérant que les complexes sont internalisés par les cavéoles et la macropinocytose viennent de nos observations en microscopie à fluorescence. La libération des anticorps est affectée en présence des inhibiteurs spécifiques des voies impliquées. De plus, les images de microscopie électronique montrent que dans les mélanges, on a de grandes vésicules ( $> 1 \mu\text{m}$ ) et de petites vésicules (25-80 nm), suggérant l'implication possible de plusieurs voies d'internalisation. Les deux voies identifiées par cytométrie en flux semblent être en accord avec la taille des vésicules observées en microscopie électronique.

En outre, sur une section de cellule ayant délivré l'anticorps anti-K8 en microscopie électronique, de nombreux complexes lipidiques sont observés. Les régions de fluorescence intenses correspondent à des structures lipidiques multilamellaires en microscopie électronique. On suppose que la forte présence de gros complexes implique majoritairement la macropinocytose. Cependant, lorsque la voie des cavéoles est inhibée spécifiquement à l'aide d'un siRNA Cav-1, nous avons observé qu'il existe un petit nombre de cellules qui présentent un marquage du cytosquelette. Ceci indique l'importance majeure de la voie cavéolaire dans la délivrance des anticorps. La macropinocytose semble être faiblement impliquée pour délivrer les anticorps. Il semble donc que tous les gros complexes internalisés ne permettent pas aux anticorps d'atteindre leur cible. En conséquence, les données suggèrent fortement que les complexes pénètrent dans les cellules préférentiellement par les cavéoles. L'implication de la voie des cavéoles dans la délivrance des anticorps est très intéressante. Récemment, l'endocytose médiée par les cavéoles a été décrite pour la délivrance de protéines par des lipides cationiques avec un groupement de tête de type lysine (Sarker et al., 2014). Des études d'inhibition ont montré que le mécanisme d'internalisation cellulaire de ces complexes emprunte la voie dépendante des cavéoles et que les protéines étaient libérées dans des endosomes ou des caveosomes.

Nous avons démontré que les complexes sont internalisés par endocytose. Ils sont piégés dans les endosomes et doivent sortir afin que les anticorps atteignent leur cible. Les expériences ATR-FTIR permettent de suggérer un mode d'échappement endosomal. Nous avons pu démontrer que des anticorps ont été détachés de la bicouche de lipides cationiques après addition de lipides anioniques. Ce résultat suggère l'implication d'un mécanisme de "flip-flop". Les anticorps ont pu se dissocier des complexes et s'échapper de la membrane endosomale via ce mécanisme d'échappement endosomal. Les lipides anioniques de la membrane endosomique se diffusent latéralement et forment des paires d'ions neutres avec les lipides cationiques des complexes (Zelphati and Szoka, 1996). En conséquence, les anticorps sont déplacés des complexes, ce qui permet à l'anticorps d'être libéré dans le cytoplasme.

**Conclusion :** Dans ces études, nous avons pu délivrer de manière efficace la protéine thérapeutique anti-K8 dans des cellules exprimant le CFTR sauvage ou muté via deux systèmes de délivrance différents. Cette approche pourrait offrir un outil pour l'étude des

canalopathies et le développement de futures stratégies thérapeutiques. Ces études nous ont permis de confirmer la présence des anticorps dans les cellules et d'en comprendre les mécanismes d'action. La délivrance intracellulaire d'un anticorps fluorescent thérapeutique a permis de souligner l'importance de la nature du vecteur. La nature de la tête polaire joue un rôle essentiel dans l'efficacité de délivrance de protéines. En effet, pour une même protéine, deux vecteurs différents permettent la délivrance efficace de la protéine. La tête polaire ribostamycine est aussi efficace que le vecteur avec la tête polaire paromomycine associé à un colipide. On remarque que, dans ce cas, le lipoaminoglycoside ribostamycine joue le même rôle que le colipide MM27, conduisant à améliorer les étapes de délivrance notamment celle de l'échappement endosomal. Enfin, ce lipoaminoglycoside unique représente une étape importante vers le développement d'un système de délivrance synthétique pharmaceutiquement acceptable pour la délivrance intracellulaire pour tous les anticorps désirés.







## **Références bibliographiques**



## **Références bibliographiques**

Abdelhady, H.G., Allen, S., Davies, M.C., Roberts, C.J., Tendler, S.J.B., and Williams, P.M. (2003). Direct real-time molecular scale visualisation of the degradation of condensed DNA complexes exposed to DNase I. *Nucleic Acids Res.* *31*, 4001–4005.

Abraham, A., Natraj, U., Karande, A.A., Gulati, A., Murthy, M.R.N., Murugesan, S., Mukunda, P., and Savithri, H.S. (2016). Intracellular delivery of antibodies by chimeric *Sesbania mosaic virus* (SeMV) virus like particles. *Sci. Rep.* *6*, 21803.

Adamo, A., Roushdy, O., Dokov, R., Sharei, A., and Jensen, K.F. (2013). Microfluidic jet injection for delivering macromolecules into cells. *J. Micromechanics Microengineering Struct. Devices Syst.* *23*.

Akagi, T., Shima, F., and Akashi, M. (2011). Intracellular degradation and distribution of protein-encapsulated amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles. *Biomaterials* *32*, 4959–4967.

Al-Dosari, M.S., and Gao, X. (2009). Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J.* *11*, 671–681.

Areschoug, T., and Gordon, S. (2009). Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.* *11*, 1160–1169.

Audouy, S.A.L., de Leij, L.F.M.H., Hoekstra, D., and Molema, G. (2002). In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. *Pharm. Res.* *19*, 1599–1605.

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

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

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

Behr, J.-P. (1994). Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjug. Chem.* *5*, 382–389.

Behr, J.-P. (1997). The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chim. Int. J. Chem.* *51*, 34–36.

- Belmont, P., Aissaoui, A., Hauchecorne, M., Oudrhiri, N., Petit, L., Vigneron, J.-P., Lehn, J.-M., and Lehn, P. (2002). Aminoglycoside-derived cationic lipids as efficient vectors for gene transfection in vitro and in vivo. *J. Gene Med.* 4, 517–526.
- Benmerah, A., and Lamaze, C. (2007). Clathrin-coated pits: Vive la différence? *Traffic* 8, 970–982.
- Benn, S.C., Ay, I., Bastia, E., Chian, R.-J., Celia, S.A., Pepinsky, R.B., Fishman, P.S., Brown, R.H., and Francis, J.W. (2005). Tetanus toxin fragment C fusion facilitates protein delivery to CNS neurons from cerebrospinal fluid in mice. *J. Neurochem.* 95, 1118–1131.
- Bera, S., Zhanel, G.G., and Schweizer, F. (2010). Antibacterial activity of guanidinylated neomycin B- and kanamycin A-derived amphiphilic lipid conjugates. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1224–1227.
- Billiet, L., Gomez, J.-P., Berchel, M., Jaffrès, P.-A., Le Gall, T., Montier, T., Bertrand, E., Cheradame, H., Guégan, P., Mével, M., et al. (2012). Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line. *Biomaterials* 33, 2980–2990.
- Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., et al. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475–480.
- Block, J., Schroeder, V., Pawelzyk, P., Willenbacher, N., and Köster, S. (2015). Physical properties of cytoplasmic intermediate filaments. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1853, 3053–3064.
- Bloomfield, V.A. (1997). DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers* 44, 269–282.
- Borchard, G. (2001). Chitosans for gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52, 145–150.
- Boussif, O., Lezoualc’h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7297–7301.
- Braun, S. (2008). Muscular gene transfer using nonviral vectors. *Curr. Gene Ther.* 8, 391–405.
- Briggman, K.L., and Bock, D.D. (2012). Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 154–161.
- Brooks, H., Lebleu, B., and Vivès, E. (2005). Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 559–577.
- Castano, S., and Desbat, B. (2005). Structure and orientation study of fusion peptide FP23 of gp41 from HIV-1 alone or inserted into various lipid membrane models (mono-, bi- and multibi-layers) by FT-IR spectroscopies and Brewster angle microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1715, 81–95.

- Champion, J.A., and Mitragotri, S. (2006). Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 4930–4934.
- Chatin, B., Mével, M., Devallière, J., Dallet, L., Haudebourg, T., Peuziat, P., Colombani, T., Berchel, M., Lambert, O., Edelman, A., et al. (2015). Liposome-based Formulation for Intracellular Delivery of Functional Proteins. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *4*, e244.
- Colas, J., Faure, G., Saussereau, E., Trudel, S., Rabeh, W.M., Bitam, S., Guerrero, I.C., Fritsch, J., Sermet-Gaudelus, I., Davezac, N., et al. (2012). Disruption of cytokeratin-8 interaction with F508del-CFTR corrects its functional defect. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 623–634.
- Colombani, T., Peuziat, P., Dallet, L., Haudebourg, T., Mével, M., Berchel, M., Lambert, O., Habrant, D., and Pitard, B. (2017). Self-assembling complexes between binary mixtures of lipids with different linkers and nucleic acids promote universal mRNA, DNA and siRNA delivery. *J. Controlled Release* *249*, 131–142.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* *422*, 37–44.
- Davezac, N., Tondelier, D., Lipecka, J., Fanen, P., Demaugre, F., Debski, J., Dadlez, M., Schratzenholz, A., Cahill, M.A., and Edelman, A. (2004). Global proteomic approach unmasks involvement of keratins 8 and 18 in the delivery of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/F508-CFTR to the plasma membrane. *PROTEOMICS* *4*, 3833–3844.
- Davis, M.E. (2002). Non-viral gene delivery systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* *13*, 128–131.
- Demeneix, B., and Behr, J.-P. (2005). Polyethylenimine (PEI). *Adv. Genet.* *53*, 217–230.
- Desigaux, L., Gourden, C., Bello-Roufaï, M., Richard, P., Oudrhiri, N., Lehn, P., Escande, D., Pollard, H., and Pitard, B. (2005). Nonionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the lung. *Hum. Gene Ther.* *16*, 821–829.
- Desigaux, L., Sainlos, M., Lambert, O., Chevre, R., Letrou-Bonneval, E., Vigneron, J.-P., Lehn, P., Lehn, J.-M., and Pitard, B. (2007). Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 16534–16539.
- Dingermann, T. (2008). Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges. *Biotechnol. J.* *3*, 90–97.
- Dunlap, D.D., Maggi, A., Soria, M.R., and Monaco, L. (1997). Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res.* *25*, 3095–3101.
- Edelman, A. (2014). Cytoskeleton and CFTR. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *52*, 68–72.
- Endo, Y., and Tsurugi, K. (1987). RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.* *262*, 8128–8130.



- Eschbach, J.W., Egrie, J.C., Downing, M.R., Browne, J.K., and Adamson, J.W. (1987). Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N. Engl. J. Med.* *316*, 73–78.
- Falnes, P.O., and Sandvig, K. (2000). Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 407–413.
- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L.L., Pepinsky, B., and Barsoum, J. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 664–668.
- Felgner, J.H., Kumar, R., Sridhar, C.N., Wheeler, C.J., Tsai, Y.J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., and Felgner, P.L. (1994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* *269*, 2550–2561.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7413–7417.
- Fintini, D., Brufani, C., and Cappa, M. (2009). Profile of mecasermin for the long-term treatment of growth failure in children and adolescents with severe primary IGF-1 deficiency. *Ther. Clin. Risk Manag.* *5*, 553–559.
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Kriegelstein, J., and Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *ResearchGate* *24*, 1121–1131.
- Fraley, R., Wilschut, J., Düzgüneş, N., Smith, C., and Papahadjopoulos, D. (1980). Studies on the mechanism of membrane fusion: role of phosphate in promoting calcium ion induced fusion of phospholipid vesicles. *Biochemistry (Mosc.)* *19*, 6021–6029.
- Fuchs, E., and Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annu. Rev. Biochem.* *63*, 345–382.
- Fuchs, H.J., Borowitz, D.S., Christiansen, D.H., Morris, E.M., Nash, M.L., Ramsey, B.W., Rosenstein, B.J., Smith, A.L., and Wohl, M.E. (1994). Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N. Engl. J. Med.* *331*, 637–642.
- Gao, X., and Huang, L. (1995). Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther.* *2*, 710–722.
- Gardlík, R., Pálffy, R., Hodosy, J., Lukács, J., Turna, J., and Celec, P. (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *11*, RA110-121.
- Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S.B., and Minsky, A. (1993). Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry (Mosc.)* *32*, 7143–7151.

- Ginn, S.L., Alexander, I.E., Edelstein, M.L., Abedi, M.R., and Wixon, J. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *J. Gene Med.* *15*, 65–77.
- Goncalves, C. (2004). Macropinocytosis of Polyplexes and Recycling of Plasmid via the Clathrin-Dependent Pathway Impair the Transfection Efficiency of Human Hepatocarcinoma Cells\*1. *Mol. Ther.* *10*, 373–385.
- Gottlieb, T.A., Ivanov, I.E., Adesnik, M., and Sabatini, D.D. (1993). Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* *120*, 695–710.
- Graessmann, M., and Graessmann, A. (1989). The biological activity of early SV40 antisense RNA and DNA molecules. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *144*, 97–103.
- Grinstein, S., Rotin, D., and Mason, M.J. (1989). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* *988*, 73–97.
- van der Gun, B.T.F., Monami, A., Laarmann, S., Raskó, T., Ślaska-Kiss, K., Weinhold, E., Wasserkort, R., de Leij, L.F.M.H., Ruiters, M.H.J., Kiss, A., et al. (2007). Serum insensitive, intranuclear protein delivery by the multipurpose cationic lipid Saint-2. *J. Controlled Release* *123*, 228–238.
- Habrant, D., Peuziat, P., Colombani, T., Dallet, L., Gehin, J., Goudeau, E., Evrard, B., Lambert, O., Haudebourg, T., and Pitard, B. (2016). Design of Ionizable Lipids To Overcome the Limiting Step of Endosomal Escape: Application in the Intracellular Delivery of mRNA, DNA, and siRNA. *J. Med. Chem.* *59*, 3046–3062.
- Haensler, J., and Szoka, F.C. (1993). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug. Chem.* *4*, 372–379.
- Hafez, I.M., Maurer, N., and Cullis, P.R. (2001). On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther.* *8*, 1188–1196.
- Hattori, Y., Suzuki, S., Kawakami, S., Yamashita, F., and Hashida, M. (2005). The role of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) in targeted gene delivery with mannosylated cationic liposomes via intravenous route. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *108*, 484–495.
- Hefesha, H., Loew, S., Liu, X., May, S., and Fahr, A. (2011). Transfer mechanism of temoporfin between liposomal membranes. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *150*, 279–286.
- Hendrix, M., Priestley, E.S., Joyce, G.F., and Wong, C.H. (1997). Direct observation of aminoglycoside-RNA interactions by surface plasmon resonance. *J. Am. Chem. Soc.* *119*, 3641–3648.
- Herrmann, H., Bär, H., Kreplak, L., Strelkov, S.V., and Aebi, U. (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 562–573.

- Hewlett, L.J., Prescott, A.R., and Watts, C. (1994). The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J. Cell Biol.* *124*, 689–703.
- Hoekstra, D., Rejman, J., Wasungu, L., Shi, F., and Zuhorn, I. (2007). Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 68.
- Huang, Y., Liu, X., Dong, L., Liu, Z., He, X., and Liu, W. (2011). Development of viral vectors for gene therapy for chronic pain. *Pain Res. Treat.* *2011*, 968218.
- Janes, K.A., Calvo, P., and Alonso, M.J. (2001). Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *47*, 83–97.
- Kamimura, K., Suda, T., Zhang, G., and Liu, D. (2011). Advances in Gene Delivery Systems. *Pharm. Med.* *25*, 293–306.
- Kerr, M.C., and Teasdale, R.D. (2009). Defining Macropinocytosis. *Traffic* *10*, 364–371.
- Khalil, I.A., Kogure, K., Akita, H., and Harashima, H. (2006). Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* *58*, 32–45.
- Kim, H.J., Greenleaf, J.F., Kinnick, R.R., Bronk, J.T., and Bolander, M.E. (1996). Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* *7*, 1339–1346.
- Klein, T.M., Arentzen, R., Lewis, P.A., and Fitzpatrick-McElligott, S. (1992). Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* *10*, 286–291.
- Kloeckner, J., Boeckle, S., Persson, D., Roedl, W., Ogris, M., Berg, K., and Wagner, E. (2006). DNA polyplexes based on degradable oligoethylenimine-derivatives: combination with EGF receptor targeting and endosomal release functions. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *116*, 115–122.
- Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C.C., Kim, M., Alexander, T., Touret, N., Hahn, K.M., and Grinstein, S. (2010). Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J. Cell Biol.* *188*, 547–563.
- 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.
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., and He, Z. (2013). The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian J. Pharm. Sci.* *8*, 1–10.
- Koynova, R., and Tenchov, B. (2010). Cationic lipids: molecular structure/ transfection activity relationships and interactions with biomembranes. *Top. Curr. Chem.* *296*, 51–93.
- Krolick, K.A., Villemez, C., Isakson, P., Uhr, J.W., and Vitetta, E.S. (1980). Selective killing of normal or neoplastic B cells by antibodies coupled to the A chain of ricin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 5419–5423.

- Kulkarni, R.V., Mutalik, S., Mangond, B.S., and Nayak, U.Y. (2012). Novel interpenetrated polymer network microbeads of natural polysaccharides for modified release of water soluble drug: in-vitro and in-vivo evaluation. *J. Pharm. Pharmacol.* *64*, 530–540.
- Kumar, V.V., and Chaudhuri, A. (2004). On the disulfide-linker strategy for designing efficacious cationic transfection lipids: an unexpected transfection profile. *FEBS Lett.* *571*, 205–211.
- Labas, R., Beilvert, F., Barteau, B., David, S., Chèvre, R., and Pitard, B. (2010). Nature as a source of inspiration for cationic lipid synthesis. *Genetica* *138*, 153–168.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Le Bihan, O., Chèvre, R., Mornet, S., Garnier, B., Pitard, B., and Lambert, O. (2011). Probing the in vitro mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale. *Nucleic Acids Res.* *39*, 1595–1609.
- Lemieux, P., Guérin, N., Paradis, G., Proulx, R., Chistyakova, L., Kabanov, A., and Alakhov, V. (2000). A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther.* *7*, 986–991.
- Leventis, R., and Silvius, J.R. (1990). Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta* *1023*, 124–132.
- Liang, W., and W. Lam, J.K. (2012). Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems. In *Molecular Regulation of Endocytosis*, B. Ceresa, ed. (InTech), p.
- Luby-Phelps, K. (2000). Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int. Rev. Cytol.* *192*, 189–221.
- Lurquin, P.F. (1997). Gene transfer by electroporation. *Mol. Biotechnol.* *7*, 5–35.
- Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., and Yan, J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *114*, 100–109.
- Ma, B., Zhang, S., Jiang, H., Zhao, B., and Lv, H. (2007). Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *123*, 184–194.
- Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S., and Gräslund, A. (2011). Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys. Hindawi Publ. Corp. Online* *2011*, 414729.
- Maloney, D.G. (2012). Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* *366*, 2008–2016.
- Martin, B., Sainlos, M., Aissaoui, A., Oudrhiri, N., Hauchecorne, M., Vigneron, J.-, Lehn, J.-, and Lehn, P. (2005). The Design of Cationic Lipids for Gene Delivery. *Curr. Pharm. Des.* *11*, 375–394.

- Maruyama, H., Higuchi, N., Kameda, S., Miyazaki, J.-I., and Gejyo, F. (2004). Rat liver-targeted naked plasmid DNA transfer by tail vein injection. *Mol. Biotechnol.* *26*, 165–172.
- McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 517–533.
- Mével, M., Neveu, C., Gonçalves, C., Yaouanc, J.-J., Pichon, C., Jaffrès, P.-A., and Midoux, P. (2008). Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays. *Chem. Commun.* 3124.
- Mével, M., Sainlos, M., Chatin, B., Oudrhiri, N., Hauchecorne, M., Lambert, O., Vigneron, J.-P., Lehn, P., Pitard, B., and Lehn, J.-M. (2012). Paromomycin and neomycin B derived cationic lipids: Synthesis and transfection studies. *J. Controlled Release* *158*, 461–469.
- Mével, M., Haudebourg, T., Colombani, T., Peuziat, P., Dallet, L., Chatin, B., Lambert, O., Berchel, M., Montier, T., Jaffrès, P.-A., et al. (2016). Important role of phosphoramido linkage in imidazole-based dioleoyl helper lipids for liposome stability and primary cell transfection: Hybrid linker composition led to higher transfection efficiency. *J. Gene Med.* *18*, 3–15.
- Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J.-J., and Jaffrès, P.-A. (2009). Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers: Histidine-rich nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* *157*, 166–178.
- Miersch, S., and Sidhu, S.S. (2016). Intracellular targeting with engineered proteins. *F1000Research* *5*.
- Mindell, J.A. (2012). Lysosomal Acidification Mechanisms<sup>\*</sup>. *Annu. Rev. Physiol.* *74*, 69–86.
- Moazed, D., and Noller, H.F. (1987). Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* *327*, 389–394.
- Moreira, C., Oliveira, H., Pires, L.R., Simões, S., Barbosa, M.A., and Pêgo, A.P. (2009). Improving chitosan-mediated gene transfer by the introduction of intracellular buffering moieties into the chitosan backbone. *Acta Biomater.* *5*, 2995–3006.
- Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A., and Benoit, J.-P. (2008). Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* *29*, 3477–3496.
- Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., and Divita, G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* *19*, 1173–1176.
- Mundra, V., and Mahato, R.I. (2014). Design of nanocarriers for efficient cellular uptake and endosomal release of small molecule and nucleic acid drugs: learning from virus. *Front. Chem. Sci. Eng.* *8*, 387–404.
- Murthy, N., Robichaud, J.R., Tirrell, D.A., Stayton, P.S., and Hoffman, A.S. (1999). The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *61*, 137–143.

- Nabi, I.R., and Le, P.U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* *161*, 673–677.
- Nayerossadat, N., Maedeh, T., and Ali, P.A. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv. Biomed. Res.* *1*.
- Ohtsuki, T., Miki, S., Kobayashi, S., Haraguchi, T., Nakata, E., Hirakawa, K., Sumita, K., Watanabe, K., and Okazaki, S. (2015). The molecular mechanism of photochemical internalization of cell penetrating peptide-cargo-photosensitizer conjugates. *Sci. Rep.* *5*, 18577.
- Orlowski, J., and Grinstein, S. (2004). Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch.* *447*, 549–565.
- Pack, D.W., Hoffman, A.S., Pun, S., and Stayton, P.S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *4*, 581–593.
- Parton, R.G., and del Pozo, M.A. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 98–112.
- Parton, R.G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 185–194.
- Parton, R.G., Hanzal-Bayer, M., and Hancock, J.F. (2006). Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J. Cell Sci.* *119*, 787–796.
- Patel, L.N., Zaro, J.L., and Shen, W.-C. (2007). Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharm. Res.* *24*, 1977–1992.
- Pathak, A., Patnaik, S., and Gupta, K.C. (2009). Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery. *Biotechnol. J.* *4*, 1559–1572.
- Pezzoli, D., Chiesa, R., De Nardo, L., and Candiani, G. (2012). We still have a long way to go to effectively deliver genes! *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* *10*, 82–91.
- Pitard, B. (2002). Supramolecular assemblies of DNA delivery systems. *Somat. Cell Mol. Genet.* *27*, 5–15.
- Pitard, B. (2004). Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic Acids Res.* *32*, e159–e159.
- Pitard, B., Aguerre, O., Airiau, M., Lachagès, A.M., Boukhnikachvili, T., Byk, G., Dubertret, C., Herviou, C., Scherman, D., Mayaux, J.F., et al. (1997). Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 14412–14417.
- Pitard, B., Oudrhiri, N., Vigneron, J.P., Hauchecorne, M., Aguerre, O., Toury, R., Airiau, M., Ramasawmy, R., Scherman, D., Crouzet, J., et al. (1999). Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 2621–2626.

- Pitard, B., Pollard, H., Agbulut, O., Lambert, O., Vilquin, J.-T., Cherel, Y., Abadie, J., Samuel, J.-L., Rigaud, J.-L., and Menoret, S. (2002). A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles. *Hum. Gene Ther.* *13*, 1767–1775.
- Plank, C., Schillinger, U., Scherer, F., Bergemann, C., Rémy, J.-S., Krötz, F., Anton, M., Lausier, J., and Rosenecker, J. (2003). The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol. Chem.* *384*, 737–747.
- Postupalenko, V., Sibler, A.-P., Desplancq, D., Nominé, Y., Spehner, D., Schultz, P., Weiss, E., and Zuber, G. (2014). Intracellular delivery of functionally active proteins using self-assembling pyridylthiourea-polyethylenimine. *J. Controlled Release* *178*, 86–94.
- del Pozo-Rodríguez, A., Pujals, S., Delgado, D., Solinís, M.A., Gascón, A.R., Giralt, E., and Pedraz, J.L. (2009). A proline-rich peptide improves cell transfection of solid lipid nanoparticle-based non-viral vectors. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *133*, 52–59.
- Purohit, P., and Stern, S. (1994). Interactions of a Small RNA with Antibiotic and RNA Ligands of the 30 S Subunit. *ResearchGate* *370*, 659–662.
- 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.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., and Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* *377*, 159–169.
- Riabowol, K.T., Gilman, M.Z., and Feramisco, J.R. (1988). Microinjection of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase induces expression of the c-fos gene. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *53 Pt 1*, 85–90.
- Richard, P., Bossard, F., Desigaux, L., Lanctin, C., Bello-Roufai, M., and Pitard, B. (2005). Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles. *Hum. Gene Ther.* *16*, 1318–1324.
- Richard-Fiardo, P., Payen, E., Chèvre, R., Zuber, J., Letrou-Bonneval, E., Beuzard, Y., and Pitard, B. (2008). Therapy of anemia in kidney failure, using plasmid encoding erythropoietin. *Hum. Gene Ther.* *19*, 331–342.
- Robinson, M.S. (2004). Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol.* *14*, 167–174.
- Rodriguez, A., del, A., and Angeles, M. (2013). Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy. In *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*, F. Martin, ed. (InTech), p.
- Rosenberg, S.A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R.A., Moen, R., Karson, E.M., Lotze, M.T., Yang, J.C., and Topalian, S.L. (1990). Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.* *323*, 570–578.

- Sainlos, M., Belmont, P., Vigneron, J.-P., Lehn, P., and Lehn, J.-M. (2003). Aminoglycoside-Derived Cationic Lipids for Gene Transfection: Synthesis of Kanamycin A Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* *2003*, 2764–2774.
- Sainlos, M., Hauchecorne, M., Oudrhiri, N., Zertal-Zidani, S., Aissaoui, A., Vigneron, J.-P., Lehn, J.-M., and Lehn, P. (2005). Kanamycin A-Derived Cationic Lipids as Vectors for Gene Transfection. *ChemBioChem* *6*, 1023–1033.
- Sandvig, K., and van Deurs, B. (2000). Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J.* *19*, 5943–5950.
- Santilman, V., Baran, J., Anand-Apte, B., Evans, R.M., and Parat, M.-O. (2007). Caveolin-1 polarization in transmigrating endothelial cells requires binding to intermediate filaments. *Angiogenesis* *10*, 297–305.
- Sarker, S.R., Hokama, R., and Takeoka, S. (2014). Intracellular Delivery of Universal Proteins Using a Lysine Headgroup Containing Cationic Liposomes: Deciphering the Uptake Mechanism. *Mol. Pharm.* *11*, 164–174.
- Selbo, P.K., Weyergang, A., Høgset, A., Norum, O.-J., Berstad, M.B., Vikdal, M., and Berg, K. (2010). Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *148*, 2–12.
- Sevimli, S., Sagnella, S., Macmillan, A., Whan, R., Kavallaris, M., Bulmus, V., and Davis, T.P. (2015). The endocytic pathway and therapeutic efficiency of doxorubicin conjugated cholesterol-derived polymers. *Biomater. Sci.* *3*, 323–335.
- Sharei, A., Zoldan, J., Adamo, A., Sim, W.Y., Cho, N., Jackson, E., Mao, S., Schneider, S., Han, M.-J., Lytton-Jean, A., et al. (2013). A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 2082–2087.
- Shirazi, R.S., Ewert, K.K., Leal, C., Majzoub, R.N., Boussein, N.F., and Safinya, C.R. (2011). Synthesis and characterization of degradable multivalent cationic lipids with disulfide-bond spacers for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*, 2156–2166.
- Simonelli, F., Maguire, A.M., Testa, F., Pierce, E.A., Mingozi, F., Bennicelli, J.L., Rossi, S., Marshall, K., Banfi, S., Surace, E.M., et al. (2010). Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis is Safe and Effective Through 1.5 Years After Vector Administration. *Mol. Ther.* *18*, 643–650.
- Smith, B.L., and Mochly-Rosen, D. (1992). Inhibition of protein kinase C function by injection of intracellular receptors for the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *188*, 1235–1240.
- Stahlhut, M., and van Deurs, B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* *11*, 325–337.



- Sternberg, B., Sorgi, F.L., and Huang, L. (1994). New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett.* *356*, 361–366.
- Stone, D. (2010). Novel viral vector systems for gene therapy. *Viruses* *2*, 1002–1007.
- Tang, F., and Hughes, J.A. (1998). Introduction of a disulfide bond into a cationic lipid enhances transgene expression of plasmid DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *242*, 141–145.
- Templeton, N.S. (2002). Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo. *Biosci. Rep.* *22*, 283–295.
- Templeton, N.S., Lasic, D.D., Frederik, P.M., Strey, H.H., Roberts, D.D., and Pavlakis, G.N. (1997). Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat. Biotechnol.* *15*, 647–652.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A., and Kay, M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 346–358.
- Tian, X., Nyberg, S., S Sharp, P., Madsen, J., Daneshpour, N., Armes, S.P., Berwick, J., Azzouz, M., Shaw, P., Abbott, N.J., et al. (2015). LRP-1-mediated intracellular antibody delivery to the Central Nervous System. *Sci. Rep.* *5*, 11990.
- Traub, L.M. (2009). Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 583–596.
- Traub, L.M. (2011). Regarding the amazing choreography of clathrin coats. *PLoS Biol.* *9*, e1001037.
- Turek, J., Dubertret, C., Jaslin, G., Antonakis, K., Scherman, D., and Pitard, B. (2000). Formulations which increase the size of lipoplexes prevent serum-associated inhibition of transfection. *J. Gene Med.* *2*, 32–40.
- Tyagi, N., Tyagi, M., Pachauri, M., and Ghosh, P.C. (2015). Potential therapeutic applications of plant toxin-ricin in cancer: challenges and advances. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *36*, 8239–8246.
- Underhill, D.M., and Goodridge, H.S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 492–502.
- Varkouhi, A.K., Scholte, M., Storm, G., and Haisma, H.J. (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *151*, 220–228.
- Vigneron, J.-P., Oudrhiri, N., Fauquet, M., Vergely, L., Bradley, J.-C., Basseville, M., Lehn, P., and Lehn, J.-M. (1996). Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 9682–9686.
- Villate-Beitia, I., Puras, G., Zarate, J., Agirre, M., Ojeda, E., and Pedraz, J.L. (2015). First Insights into Non-invasive Administration Routes for Non-viral Gene Therapy.

- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., and Birnstiel, M.L. (1992). Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 7934–7938.
- Wang, L.H., Rothberg, K.G., and Anderson, R.G. (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.* *123*, 1107–1117.
- Wasungu, L., and Hoekstra, D. (2006). Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *116*, 255–264.
- Wetzer, B., Byk, G., Frederic, M., Airiau, M., Blanche, F., Pitard, B., and Scherman, D. (2001). Reducible cationic lipids for gene transfer. *Biochem. J.* *356*, 747–756.
- Wickström, S.A., Lange, A., Hess, M.W., Polleux, J., Spatz, J.P., Krüger, M., Pfaller, K., Lambacher, A., Bloch, W., Mann, M., et al. (2010). Integrin-linked kinase controls microtubule dynamics required for plasma membrane targeting of caveolae. *Dev. Cell* *19*, 574–588.
- Wolff, J.A., Ludtke, J.J., Acsadi, G., Williams, P., and Jani, A. (1992). Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* *1*, 363–369.
- Xu, Y., and Szoka, F.C. (1996). Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry (Mosc.)* *35*, 5616–5623.
- Yan, M., Du, J., Gu, Z., Liang, M., Hu, Y., Zhang, W., Priceman, S., Wu, L., Zhou, Z.H., Liu, Z., et al. (2010). A novel intracellular protein delivery platform based on single-protein nanocapsules. *Nat. Nanotechnol.* *5*, 48–53.
- Yang, S.R., Lee, H.J., and Kim, J.-D. (2006). Histidine-conjugated poly(amino acid) derivatives for the novel endosomolytic delivery carrier of doxorubicin. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *114*, 60–68.
- Zelphati, O., and Szoka, F.C. (1996). Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 11493–11498.
- Zelphati, O., Wang, Y., Kitada, S., Reed, J.C., Felgner, P.L., and Corbeil, J. (2001). Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system. *J. Biol. Chem.* *276*, 35103–35110.
- Zhang, S., Li, J., Lykotrafitis, G., Bao, G., and Suresh, S. (2009). Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* *21*, 419–424.
- Zhi, D., Zhang, S., Wang, B., Zhao, Y., Yang, B., and Yu, S. (2010). Transfection Efficiency of Cationic Lipids with Different Hydrophobic Domains in Gene Delivery. *Bioconjug. Chem.* *21*, 563–577.
- Zhou, X., and Huang, L. (1994). DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *ResearchGate* *1189*, 195–203.

Zinselmeyer, B.H., Mackay, S.P., Schatzlein, A.G., and Uchegbu, I.F. (2002). The lower-generation polypropylenimine dendrimers are effective gene-transfer agents. *Pharm. Res.* *19*, 960–967.

Zuhorn, I.S., and Hoekstra, D. (2002). On the Mechanism of Cationic Amphiphile-mediated Transfection. To Fuse or not to Fuse: Is that the Question? *J. Membr. Biol.* *189*, 167–179.

Zuhorn, I.S., Bakowsky, U., Polushkin, E., Visser, W.H., Stuart, M.C.A., Engberts, J.B.F.N., and Hoekstra, D. (2005). Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *11*, 801–810.



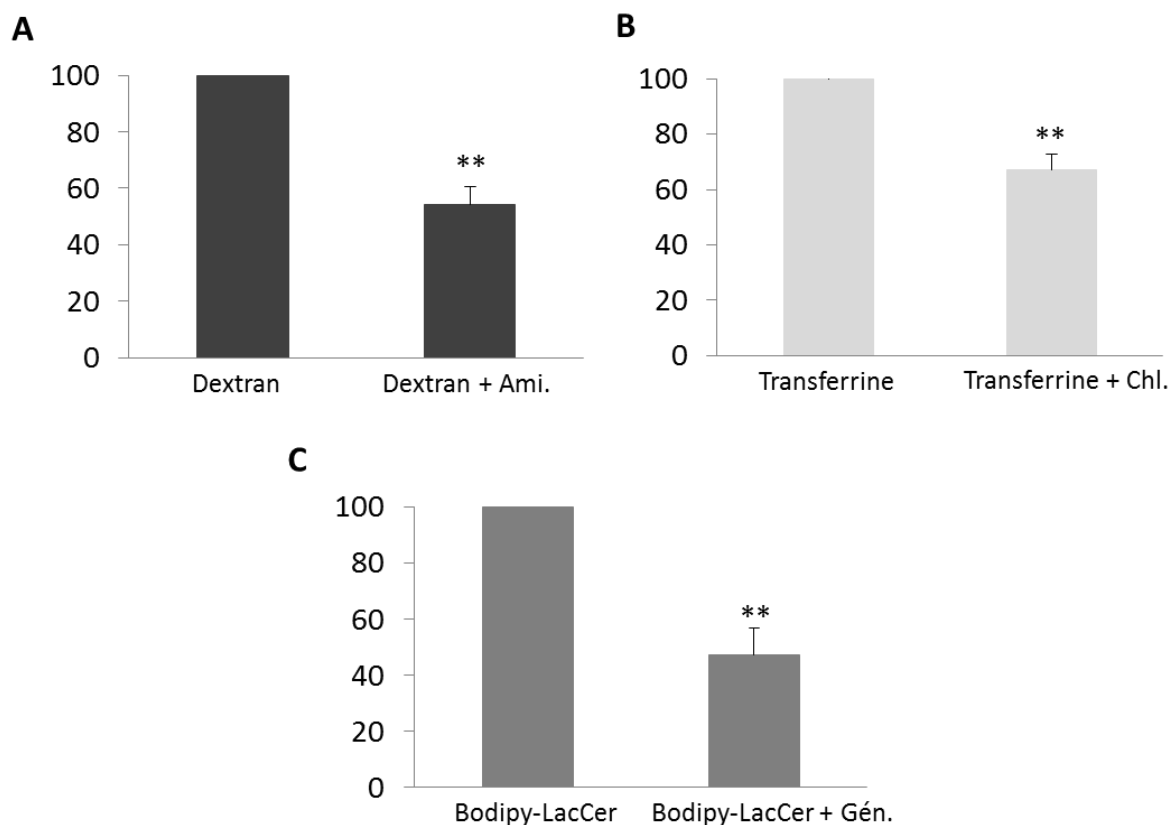


## **Annexes**



## Annexes

### Annexe 1: Marqueurs des voies d'endocytoses

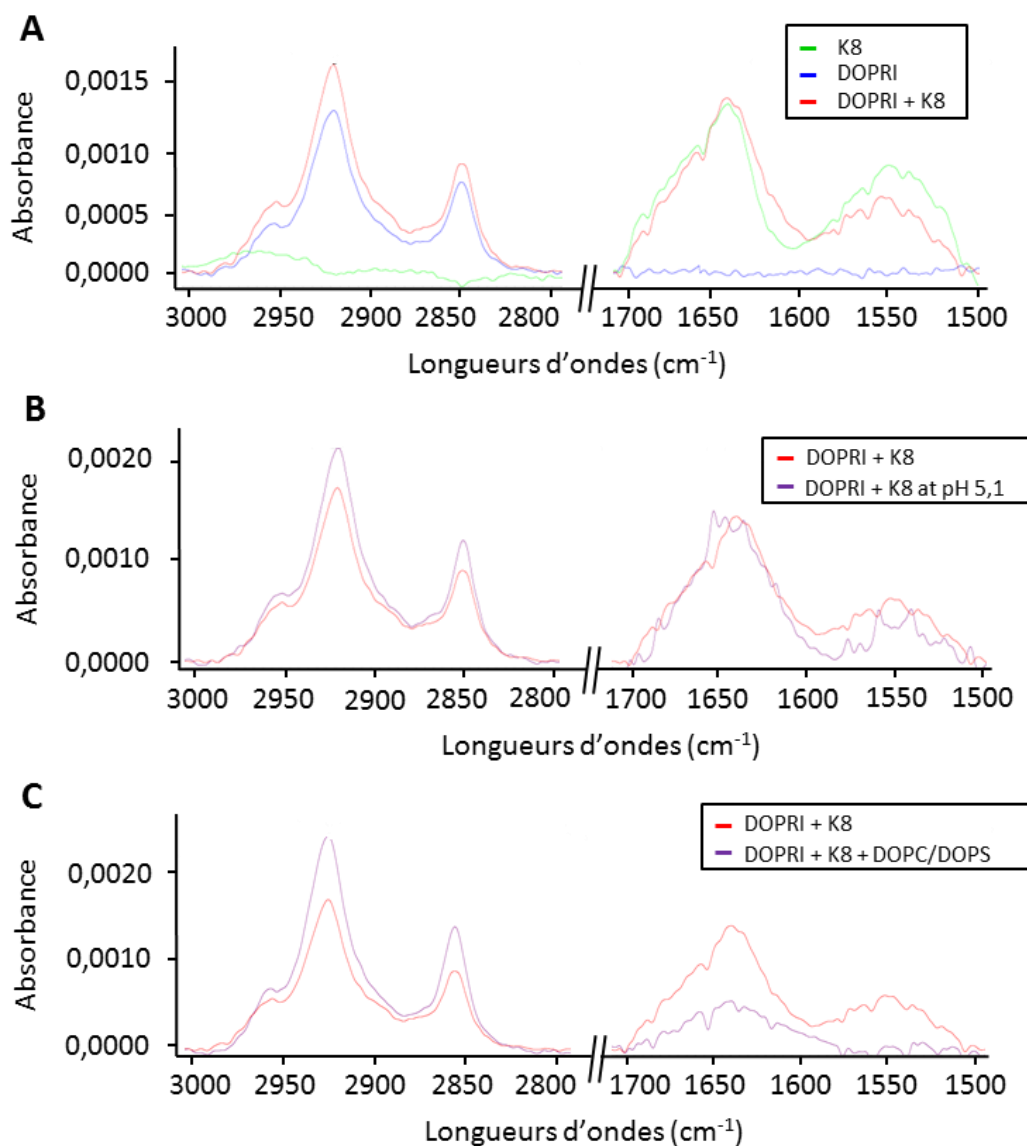


**Figure 59 : Effet des inhibiteurs sur l'internalisation des marqueurs des voies d'endocytoses.**

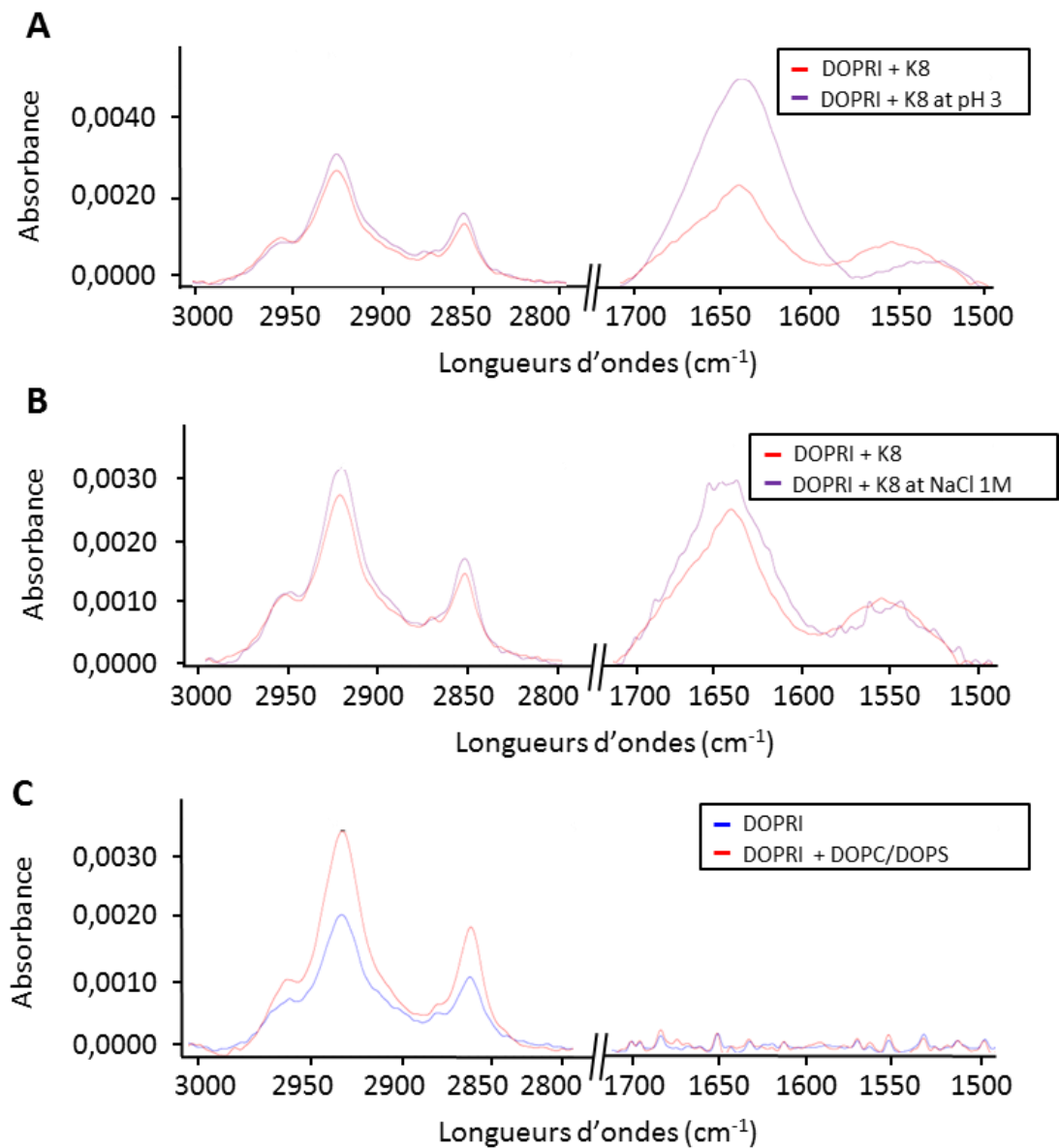
Analyse par cytométrie en flux de l'internalisation des marqueurs des voies d'endocytoses dans des cellules traitées avec divers inhibiteurs chimiques (chlorpromazine (Chl.), amiloride (Ami.) et génistéine (Gén.)). Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de fluorescence de trois expériences représentatives  $\pm$  SD.



## Annexe 2 : Spectres d'ATR-FTIR

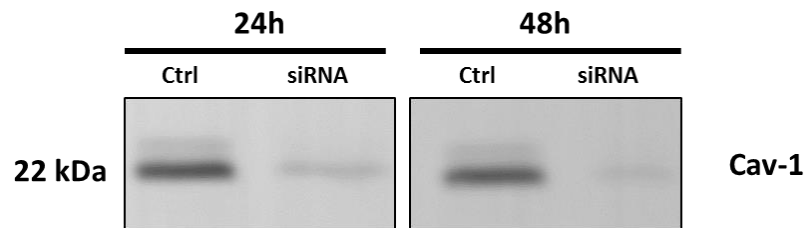


**Figure 60 : Analyse ATR-FTIR représentant l'attachement de l'anticorps à la bicouche supportée DOPRI.**  
 (A) spectres polarisés en S de l'anti-K8 en solution, de la bicouche supportée par DOPRI sans et avec l'anti-K8.  
 (B) Effet du pH 5,1 sur l'interaction de l'anti-K8 avec DOPRI. (C) Effet des liposomes anioniques DOPC/DOPS sur l'interaction de l'anti-K8 avec DOPRI induisant une libération partielle.



**Figure 61 : Analyse ATR-FTIR représentant l'attachement de l'anticorps à la bicouche supportée DOPRI.**  
 Spectres polarisés en P (A) Effet du pH 3 sur l'interaction de l'anti-K8 avec DOPRI (B) Effet du NaCl 1M sur l'interaction de l'anti-K8 avec DOPRI (C) Effet des liposomes anioniques DOPC/DOPS sur la bicouche DOPRI.

### Annexe 3 : Western Blot



**Figure 62 : Analyse de l'extinction du gène Cav-1 par Western Blot.**

Après 6h de transfection avec un siRNA Cav-1, les cellules ont été analysés par western blot 24h ou 48h après l'arrêt de la transfection.

## **Annexe 4 : Article 5**

L'article suivant est en cours de soumission dans **Journal of Controlled Release** et reprend les résultats présentées dans le **chapitre3 des résultats**.

**Laurence Dallet<sup>1,2</sup>, Marion Decossas<sup>1</sup>, Jean-Christophe Taveau<sup>1</sup>, Sophie Lecomte<sup>1</sup>, Anna Kremer<sup>4</sup>, Bruno Pitard<sup>3,a,b</sup> and Olivier Lambert<sup>1,a</sup> Single lipoaminoglycoside promotes efficient intracellular antibody delivery: a comprehensive insights of the mechanism of action.** En soumission dans Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine

## **Single lipoaminoglycoside promotes efficient intracellular antibody delivery: a comprehensive insight into the mechanism of action**

**Laurence Dallet<sup>1,2</sup>, Marion Decossas<sup>1</sup>, Jean-Christophe Taveau<sup>1</sup>, Sophie Lecomte<sup>1</sup>, Anna Kremer<sup>4</sup>, Bruno Pitard<sup>3,a,b</sup> and Olivier Lambert<sup>1,a</sup>**

<sup>1</sup> CBMN UMR-CNRS 5248, Université de Bordeaux IPB, Pessac, France

<sup>2</sup> CRCINA, INSERM Université d'Angers, Université de Nantes, France

<sup>3</sup> In-Cell-Art, Nantes, France

<sup>4</sup> VIB BioImaging Core, Ghent, Belgium, VIB Center for Inflammation Research, Ghent, Belgium, Department of Biomedical Molecular Biology, Ghent University, Ghent, Belgium

<sup>a</sup> both authors contributed equally to this work

\* corresponding author:

[bruno.pitard@univ-nantes.fr](mailto:bruno.pitard@univ-nantes.fr)

[o.lambert@cbmn.u-bordeaux.fr](mailto:o.lambert@cbmn.u-bordeaux.fr)

<sup>b</sup> present address: CRCINA, INSERM Université d'Angers, Université de Nantes, France

### Abstract

Delivery of biologically active protein into cells is emerging as an important strategy for both fundamental and therapeutic applications. Previous experiments have shown that lipidic derivatives of natural aminosugars (lipoaminoglycoside) were capable of *in vitro* delivery of the anti-cytokeratin8 antibody (anti-K8) but only when formulated with lipid helpers for endosomal escape which could lead to toxicity by the excess of lipids. Here, we designed *in vitro* anti-K8 delivery with various lipoaminoglycosides in the absence of a lipid helper. Results led to the identification of the aminoglycoside lipid dioleoyl phosphoramidate ribostamycin (DOPRI) as a potent intracellular delivery system for anti-K8. Correlative light and electron microscopy reveals that delivered anti-K8 molecules were bound efficiently to intermediate filaments within the cells. Biophysical and cell biological techniques have been carried out to decipher the DOPRI mechanism of action. Anti-K8 were bound to the surface of DOPRI vesicles without perturbing lipid organization. The complexes were stable under low pH or high NaCl concentration but were destabilized in the presence of anionic lipid. As indicated by inhibitors of endocytic pathways, both macropinocytosis and caveolae contributed to anti-K8 internalization and also to filament labelling with a preference for the caveolin pathway. Transmission electron microscopy (TEM) and cryo-TEM showed that DOPRI/anti-K8 complexes form small and large vesicles whose sizes were compatible with endocytosis using these two pathways. The results clearly showed that the unique properties of DOPRI were sufficient for efficient intracellular protein delivery without requiring a lipid helper. This strategy could prove effective in formulating therapeutic antibody strategies against numerous diseases.

Keywords: antibodies, lipoaminoglycosides, intracellular delivery, supramolecular structure

## INTRODUCTION

Today, antibodies represent a new class of therapeutic molecules in their own right with powerful biomedical potential and applications. The majority of these antibodies are used in the treatment of cancer [1] but recently antibodies have also been approved for the treatment of metabolic diseases such as hypercholesterolaemia targeting the PCSK9 protein. Numerous clinical trials are currently underway and many studies are being conducted to identify novel antibodies that could potentially become therapeutics. Nevertheless, all of these antibodies target soluble or extracellular proteins. Due to their hydrophilic nature and high molecular mass antibodies do not cross the cellular membrane. This is an important limitation for extending their use to intracellular targets [2,3]. Development of a simple, effective and nontoxic means of allowing intracellular delivery of antibodies against many cytoplasmic targets is therefore of crucial interest for developing effective, specific antibody therapies. By way of example, cystic fibrosis is related to a functional defect in cystic fibrosis transmembrane conductance (CFTR) intracellular trafficking. The mutated CFTR protein interacts with the cytoskeletal protein keratin 8, preventing CFTR proteins from migrating to the plasma membrane [4]. For those pathologies associated with abnormal trafficking of key proteins, we had previously published a system of intracellular vectorization of an enzyme and antibody against keratin 8 (anti-K8) that led to retrieval of an activity of mutated CFTR in treated cells [5]. However, the intracellular delivery of anti-K8 required the use of mixed liposomes consisting of at least one cationic lipid for binding to the antibody but also a neutral lipid based on an imidazole ring to promote endosomal escape. This lipid formulation resulted in a complex supramolecular assembly of large size whose multilamellar structure was an essential characteristic of endosomal escape. The endosomal escape was achieved by lysis of the vesicles under the osmotic pressure resulting from the accumulation of protons during the acidification of the endosomes caused by the neutral protonable imidazole lipid present in the

multilamellar structure. The use of mixed liposomes containing as much cationic lipid as neutral lipid, may increase the risk of cellular toxicity as it can lead to endosomal lysis and lipid excess. In this context, the use of a single lipid forming the vesicles containing the antibody will be much simpler and less toxic. To this end, we have designed an approach to study the structure-function relationships between the properties of lipid/antibody assemblies and the efficiency of intracellular delivery. We have already successfully used this approach to discover new supramolecular vectors and assemblies to deliver nucleic acid molecules such as DNA, siRNAs and mRNAs within cells [6–8]. The lipid family used is derived from natural molecules based on aminosugars capable of engaging specific interactions with nucleic acids. Given the flexibility of their polar region, aminosugars could also be suitable to bind amino acid residues of antibodies involving hydrogen bonding and electrostatic interactions. In order to identify a single compound capable of delivering a full length antibody to the cytoplasm in the cell, we selected representatives of this family by taking different polar region, linkers and hydrophobic parts. In the present study, we also present the mechanism of action by which a unique lipidic derivative of ribostamycin allows the fixation of an antibody specific to the intermediate filaments of the cytoskeleton. The morphological characteristics and physicochemical properties of complexes were also investigated by transmission electron microscopy and focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM).



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Preparation of liposomes**

DSST (Distearyl-succinyl-tobramycin), DPST (Dipalmityl-succinyl-tobramycin), DMST (Dimyristyl-succinyl-tobramycin) and DOSP (dioleyl-succinyl-paromomycin) are synthesized respectively as previously described [6,7] and kindly provided by In Cell Art (Nantes, France). DOPRI and DOSRI were prepared using ribostamycin as polar headgroup linked through a phosphoramidate or an amine linker to a dioleyl hydrophobic moiety, respectively according to procedures adapted from [9] and provided by In Cell Art (Nantes, France).

### **Formulation of lipid/protein complexes**

Mouse FITC anti-cytokeratin-8 directed against the C terminal region (anti-K8) ([SB37b], Abcam) was diluted with optiMEM (Life Technologies) medium at the indicated final concentration. Lipoaminoglycoside stock solution in water were diluted in OptiMEM and added to protein solution (v/v) at lipid/protein molar ratios (MR) 1500. The resulting solution was mixed gently and incubated for 20 minutes at room temperature before incubation with cells.

### **Cell culture**

HeLa (Human cervical adenocarcinoma) were cultured in DMEM (Life Technologies). Media was supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin and 10% fetal calf serum obtained from Life Technologies. Cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere.

### **Anti-K8 delivery within HeLa cells**

For time-dependent experiments and correlative microscopy, cells were seeded at a density of 10<sup>4</sup> cells per dish (glass bottom gridded, MatTek Corporation) in 2 ml of the appropriate complete growth medium and were grown for two days to obtain 40% confluence. Medium

was replaced 30 minutes before transfection with 2 ml optiMEM. Lipid/protein complexes prepared in 0.5 ml volume were added to cells. Live fluorescence microscopy was performed at the indicated times using Leica DMI6000B equipped with CCD camera. After 4 hours incubation, cells were washed with PBS and processed for correlative experiments (see correlative microscopy section).

For internalization studies, cells were seeded on 24 well plates (50,000 cells/well) using complete medium and allowed to adhere over 48 hours. Chemical endocytosis inhibitors (chlorpromazine, 15  $\mu$ M; genistein, 150  $\mu$ M; amiloride, 50 nM) were added to OptiMEM medium 30 min before complex addition. Cells were incubated for 4 hours with lipid/protein complexes in the presence of inhibitors or in unsupplemented OptiMEM as a negative control. Cells were prepared for flow cytometry or fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for observations using fluorescence microscopy.

For Caveolin 1 (Cav-1) silencing, the siRNA oligomers targeting caveolin-1 (Stealth RNAi Cav1MSS273502) were purchased from Invitrogen and transfected into HeLa cells at 10 nM using Lipofectamine RNAiMAX in Opti-MEM medium (Invitrogen) according to the manufacturer recommendations. Non-targeting siRNA (Stealth RNAi negative control duplexes, Invitrogen) was used as control siRNA. Anti-K8 delivery experiments were carried out 24 hours after siRNA transfection. Then, cells were incubated with lipid/protein complexes for 4 hours and prepared for analysis by flow cytometry or fluorescence microscopy.

### **Correlative Light and Transmission Electron Microscopy (CLEM)**

After PBS washing, cells were fixed with 4% PFA and 0.1% glutaraldehyde in PBS for 30 minutes at room temperature and permeabilized with 0.1% saponin in PBS for 3 minutes. Cells were subsequently immunostained with the rabbit anti-mouse fluoronanogold<sup>TM</sup> antibody (FNG-A594-Au) (Nanoprobes) to localize the FITC anti-K8 antibody as follows.

Cells were washed with PBS and incubated with FNG-A594-Au (0.008 $\mu$ g/ml) diluted in 0.2% acetylated bovine serum albumin (BSA-c<sup>TM</sup>, Aurion) in PBS for 1 hour. Cells were visualized with an epifluorescence microscope (Leica DMI6000B). After wash in milliQ water, the diameter of the gold nanoparticles was increased by using a silver enhancement kit (HQ silver; Nanoprobes) for 2 minutes at RT in the dark. Then, after wash in milliQ water, cells were post-fixed using 1% (v/v) osmium tetroxide in PBS for 10 minutes and embedded in Epon (Epon; Inland Europe). Ultrathin sections (50 nm) were collected on butvar-coated single-slot copper grids and were stained with 2% (v/v) aqueous uranyl acetate for 30 minutes and with lead citrate for 2 minutes. Grids were examined using a 120kV CM120 (FEI) transmission electron microscope.

#### **Serial sectioning using Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM)**

For FIB-SEM tomography another part of the resin embedded sample used for CLEM, was mounted on an aluminum stub and coated with  $\sim$ 8 nm of platinum (Quorum Q150T ES). FIB-SEM imaging was performed using a Zeiss Auriga Crossbeam system with Atlas3D software. The focused ion beam was set to remove 10 nm sections with the gallium ions. Imaging was done at 1.5 kV using an ESB (back-scattered electron) detector. Three-dimensional reconstruction and segmentation were generated from the image stacks using Fiji ImageJ (NIH) and Chimera softwares. An automatic segmentation of the FIB-SEM volume based on 3D Hough Spherical Transform (lab-made ImageJ script) has been performed to count high density particles for estimating the number of gold beads.

#### **Attenuated Total Reflection – Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR)**

Polarized ATR-FTIR spectra were recorded on a Nicolet 6700 FT-IR spectrometer (Nicolet Instrument) equipped with a lipid nitrogen cooled mercury-cadmium-telluride detector (ThermoFisherScientific) with a spectral resolution of 4 cm<sup>-1</sup> and a one-level zero filling. Lipid bilayers adsorbed on a germanium ATR crystal were obtained by spontaneous fusion of

a 2 mg/ml DOPRI small unilamellar vesicles (SUV) prepared by tip sonication. After bilayer formation at the crystal surface, the excess on SUV was removed by a 20 mM Tris HCl pH 7.4 buffer solution. 10 $\mu$ l of anti-K8 at 0.05 $\mu$ g/ $\mu$ l were added and rinsed after 20 minutes before spectrum recording. The effects of acidic pH (pH 5.1 and pH 3), high salt concentration (NaCl 1M) and anionic lipids (2 mg/ml DOPC:DOPS 1:1) were further analyzed by recording spectra. Since ATR spectroscopy was sensitive to the orientation of the lipid and protein, spectra were recorded with a parallel (p) and perpendicular (s) polarization of the incident light. All the orientation information is then contained in the dichroic ratio  $R_{ATR} = A_p/A_s$ , where  $A_p$  and  $A_s$  represent the absorbance of the considered band for the p or s polarization of the incident light, respectively.

#### **Negative staining transmission electron microscopy**

After formation of the lipid/protein complexes as described above, samples were deposited on a carbon-copper grid (300 mesh) pretreated by a standard glow discharge procedure (2 mA, 0.3 mBar, 40 sec, Elmo Cordouan Technologies) for 2 minutes. Grids were rapidly rinsed with milliQ water, and then stained for 2 minutes with 2% aqueous uranyl acetate. For detection of anti-K8, samples were incubated with protein A coupled to 5 nm colloidal gold particles (1/50) (UMC Utrecht) for 15 minutes. Specimens were then observed with a 120kV CM120 (FEI) transmission electron microscope at x8,000 and x35,000 magnifications. Image acquisition was carried out using a 2k x 2k CCD camera (Gatan).

#### **Cryo electron microscopy**

Samples were applied to a holey carbon-coated copper grid pretreated by a glow discharge procedure. After removing the excess with a filter paper, the grid was plunged into a liquid ethane bath cooled with liquid nitrogen (Leica EMGP). Specimens were maintained at a temperature of -170°C using a cryo holder (Gatan) and observed with a Tecnai F20 electron

microscope operating at 200kV (FEI). Images were recorded with a 2k x 2k CCD camera (Gatan) at a nominal magnification of x50,000 under low-dose conditions.

#### **Fluorescence microscopy of anti-K8 delivery in treated cell with inhibitors and in Cav-1 silenced cells**

Cells treated with siRNA and with the different inhibitors as described before and were then exposed to lipid/protein complexes. They were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes and permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X100 for 5 minutes. Cells were rinsed and then blocked in PBS containing 1% BSA for 30 minutes. Polyclonal rabbit anti-Cav-1 antibodies (Abcam) (3.5µg/ml) were incubated overnight in PBS with 0.2% BSA. Cells were rinsed before addition of donkey anti-rabbit AlexaFluor 594 antibodies (Invitrogen) (4µg/ml) for 45 minutes. After being washed, cells were mounting in Vectashield medium (Vector Laboratories) and observed on an epifluorescence microscope (Leica DMI6000B). For each experiment, one hundred cells were observed to estimate the filament labelling.

#### **Flow cytometry analysis**

Cells were seeded on 12 well plates (95,000 cells/well) for 48h, and then incubated for 4 hours with lipid/protein complexes. After treatment and washing, cells were trypsinized and resuspended in cold BSA 0.5% in PBS. Cells were stored on ice and analyzed within 1 hour. Samples were analyzed on a BD Biosciences FACS Canto flow cytometer and FITC lipid/anti-K8 complexes were excited by a 488 nm laser. The analysis was performed using Diva software. Cell debris was excluded, based on the forward and side scatter characteristics of cell populations. The results were expressed as the percentage of the mean of fluorescence intensity. Ten thousand cells were analyzed in the gate.

### Statistical analysis of flow cytometry experiments

Data were collected from at least three separate experiments and expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. The statistical difference was analyzed by Student unpaired t-test. A p value of  $<0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### Efficiency of anti-K8 intracellular delivery with a single aminoglycoside lipidic derivative

From our previous observations [5], DOSP lipid in the absence of helper lipids was inefficient to deliver anti-K8 inside cells probably because of an impairment of endosomal escape. Referring to the lipid optimization approach developed for improving nucleic acid delivery, this led us to assess 6 other aminoglycoside lipid derivatives with different polar heads (ribostamycin, tobramycin), linkers (succinyl, phosphoramido) and hydrophobic tails (various lengths of acyl tails) (Figure 1).

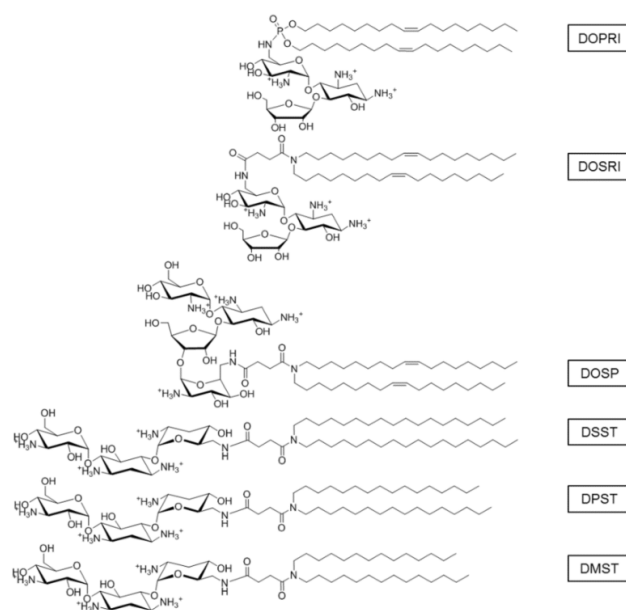
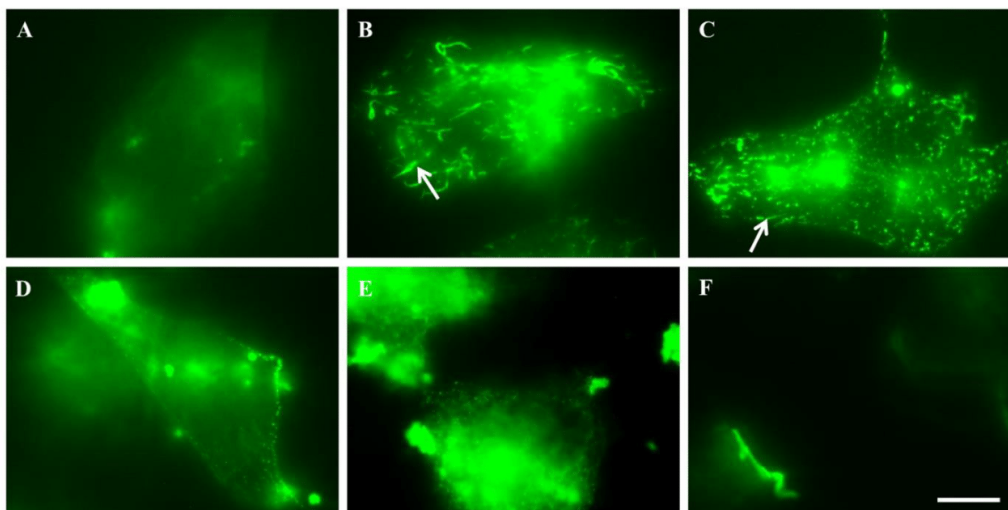


Figure 1 : Structure of different single lipoaminoglycosides.

Those compounds associated with anti-K8 were incubated with HeLa cells and analyzed by fluorescence microscopy (Figure 2).



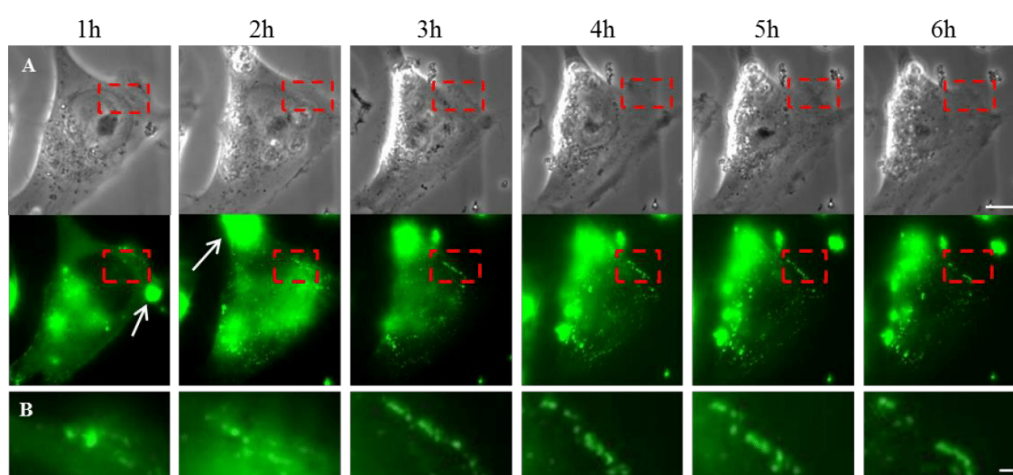
*Figure 2 : Delivery of anti-K8 using various single aminoglycoside derivatives. HeLa cells were treated with anti-K8 formulated with various aminoglycoside lipid derivatives at a lipid to protein molar ratio of 1500 for 4 hours and were analyzed by fluorescence microscopy. (A) DOSP, (B) DOSRI, (C) DOPRI, (D) DSST, (E) DPST, (F) DMST. White arrows indicate labelled filaments. Scale bar: 10 $\mu$ m.*

Unlike paromomycin and tobramycin polar heads, ribostamycin enabled a strong fluorescent labelling of filamentous structures (white arrows, Figures 2B and 2C). DOSRI that has the same backbone as DOSP, and DOPRI which has a shorter phosphoramido linker labeled filaments within 48% and 60% of observed cells respectively. The influence of the length of the acyl chains has been analyzed with three lipids, DSST, DPST and DMST made of the tobramycin polar head, the succinyl linker and C18, C16 and C14 acyl chain respectively. Few intracellular fluorescent filaments were present within a very small population of observed cells with DSST and DPST (Figures 2D and 2E). With DMST which has the shortest acyl chain, no labeled filament was visible (Figure 2F). These results indicate that ribostamycin lipid derivatives in the absence of helper lipid allows an efficient delivery of anti-K8 similar to that of previously observed with DOSP:MM27 [5]. These results underline

the importance of the polar head with respect to the other parts (i.e. linker and hydrophobic parts) of these lipid derivatives. Since DOPRI exhibits the highest efficiency, we have chosen this aminoglycoside derivative for the following experiments.

### Kinetic of intracellular delivery of anti-K8

The intracellular delivery of anti-K8 was monitored by fluorescence microscopy. Living cells were observed over a time course of 6 hours (Figure 3).



*Figure 3 : Kinetic of DOPRI/anti-K8 complex delivery visualized by live fluorescence microscopy. HeLa cells were observed 1 hour after incubation with complexes and every hour up to 6 hours (A) Phase contrast and FITC fluorescent images of the same cell. The internalization of anti-K8 is observed as large (white arrow) and weak spots (red dashed square). (B) Enlargement of the ROI (red square in (A)) showing a filament progressively labelled reaching an optimal fluorescent signal at 4 hours. Scale bars 10µm (A) and 2µm (B).*

After a 1 hour incubation with DOPRI/anti-K8 complexes, cells have internalized fluorescent complexes appearing as large spots (white arrow). In addition, weak spots were visible at the vicinity of the plasma membrane (red dashed square). Advanced incubation times revealed that more complexes were internalized within the cell. Focusing on the area delineated by the dashed square, we noticed that the fluorescent signal increased and progressively delineated a dotted and linear structure after 4 hours incubation time. After 4 hours, the signal started to vanish (Figure 3B). Of note no fluorescent signal was observed within the cells when anti-K8



was not complexed with DOPRI (data not shown). The kinetic analysis of anti-K8 delivery using DOPRI indicates that anti-K8 was gradually internalized and delivered into the cytosol demonstrating the ability of DOPRI to convey antibodies within the cytosol and to reach their target on intermediate filaments. The amount of anti-K8 antibody accumulated over time up to 4 hours incubation time. The latter has been used for the following experiments.

#### **Distribution of anti-K8 within the cell**

Even though our fluorescence imaging clearly indicated filaments labelled by anti-K8 that provides only a confirmation of the presence of anti-K8 molecules within the cytoplasm. To get a more highly resolved image of anti-K8 distribution within the cell focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM) was employed which provides a 3D view of a portion or the whole cell at a few nanometers resolution. An immunogold labelling technique using nanogold-labelled secondary antibody and a silver enhancement step was performed for anti-K8 visualization before FIB-SEM analysis. The distribution of labelling was analyzed for a cell portion of 23 x 5.6 x 2.5  $\mu\text{m}$  as drawn on Figure 4A. On a 10 nm thick FIB-SEM section, the contour of the cell was clearly delineated while cellular densities appeared as gray densities without distinguishable subcellular structures except for a circular nucleolus. Within the cell, the highly electron-dense structures corresponded to DOPRI complexes and gold particles (Figure 4B). The 3D tomogram and its 2D projection showed that a large number of gold beads were present within the cell. About 1500 particles were counted using an automatic segmentation of the FIB-SEM volume providing a reasonable estimation of the amount of delivered anti-K8 within this cell segment. They were localized close to DOPRI complexes and also near the plasma membrane on both basal and apical sides (Figures 4C and 4D). This suggests that anti-K8 are attached to or located near the DOPRI complexes which is consistent with our fluorescence experiments. More interestingly, the FIB-SEM result revealed anti-K8 molecules are broadly distributed to the vicinity of the plasma membrane

which was not visible by fluorescence microscopy but is in good agreement with the position of intermediate filaments.

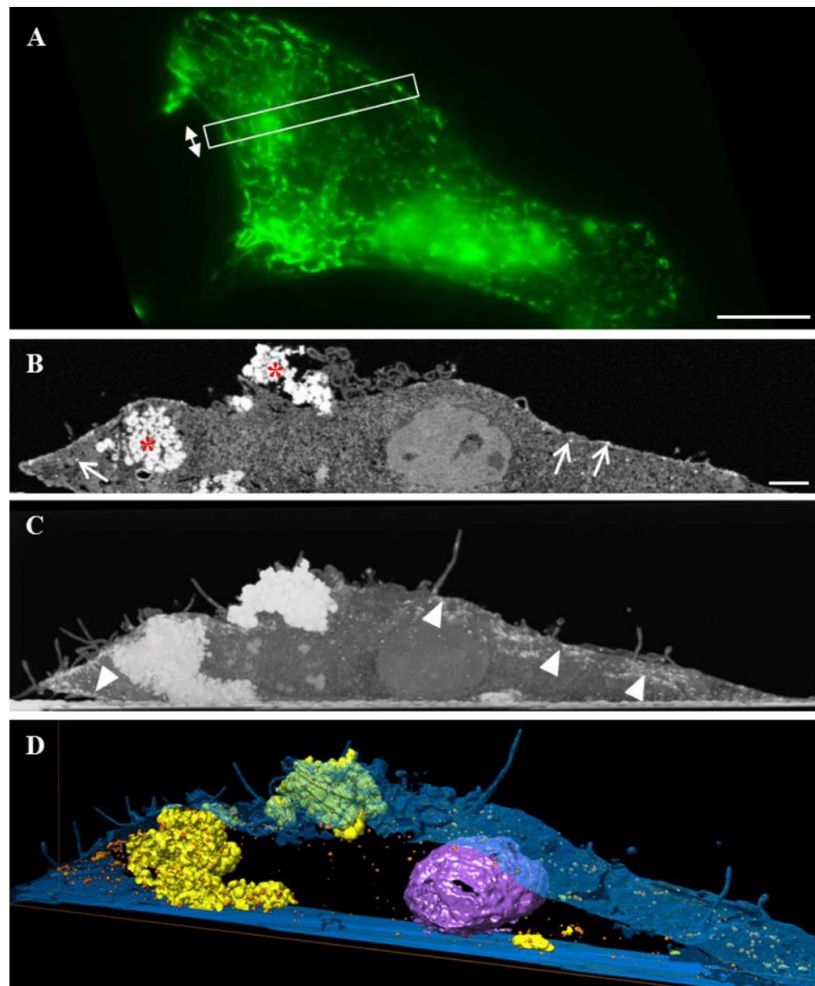
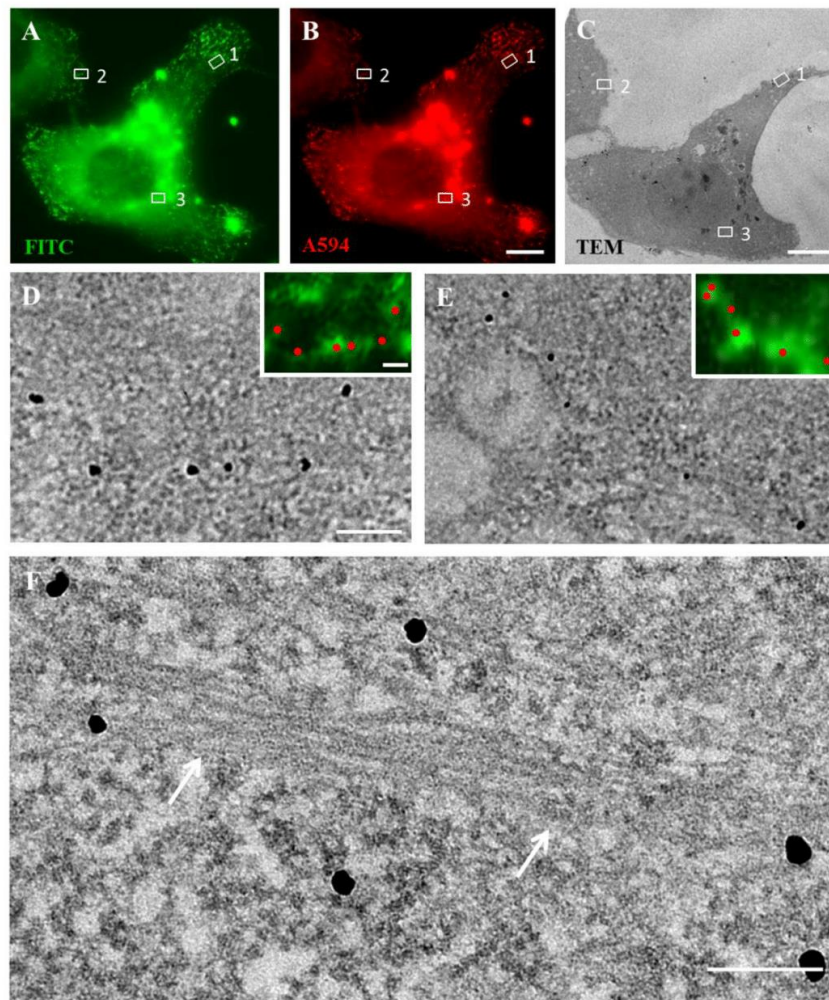


Figure 4: 3D visualization of anti-K8 distribution within the cell using automated FIB-SEM tomography.

*HeLa* cell incubated with DOPRI/anti-K8 complexes was immunogold-labelled and serial sectioned using a FIB-SEM. (A) A fluorescence image of delivered anti-K8 before FIB-SEM analysis. A  $23 \times 5.6 \times 2.5 \mu\text{m}$  rectangle delineates the cell portion visualized by FIB-SEM. (B) A 10 nm thick FIB-SEM slice viewing the cell perpendicular to the support. The cutting direction is indicated by the double arrow in (A). Electron-dense objects correspond to particles (white arrows) and lipid complexes (red asterisks). (C) A 2D slice from the tomogram reveals a large distribution of particles close to the plasma membrane (white arrow heads). (D) A 3D volume reconstruction of the corresponding 3D tomogram. Lipids, plasma membrane, nucleolus, particles are shown in yellow, blue, purple and orange respectively. Scale bars  $10\mu\text{m}$  (A) and  $1\mu\text{m}$  (B, C and D)

### **Visualization of filaments by anti-K8 using correlative light and electron microscopy**

Since due to the processing necessary for permablizing the cells to allow the fluoronanogold antibodies access to the cytoplasmic compartment, FIB-SEM resolution and contrast did not allow the visualization of filaments. Therefore, we used correlative light and transmission electron microscopy technique to get ultrastructural information on the structures labelled by the lipid/anti-K8 complexes. This approach consists in the observation of the same cell using fluorescence microscopy and TEM in order to spatially locate anti-K8 molecules with a better precision. Cells were fixed and labelled with an anti-mouse antibody (FNG-A594-Au) containing two different markers (*i.e.* nanogold beads and AlexaFluor 594) (Figure 5). The selected cell treated with DOPRI/anti-K8-FITC complexes showed an intense anti-K8 labelling of cytoskeleton filaments (Figure 5A). The AlexaFluor 594 signal showed a good correlation with FITC-anti-K8 signal, indicating that FNG-594-Au antibodies and anti-K8 were colocalized (Figures 5A and 5B). This cell was resin-embedded and areas were targeted for ultramicrotomy. TEM observations of cell sections are presented in Figures 5C-F. The TEM image shown in Figure 5C depicts an overview of the cell which shows three regions of interest (ROI) corresponding to those in Figures 5A and 5B. At higher magnification, there was an overlap of the distribution of gold particles with the fluorescent signal in the ROI 1 and 2 (Figures 5D and 5E). Gold particles have been marked in red for a better view (inset Figures 5D and 5E). A high magnification TEM image of ROI 3 showed that a few gold particles were distributed along a filament (Figure 5F) in good correlation with the corresponding fluorescent signal. These filaments were ~ 8 nm in diameter that corresponds to the expected diameter for intermediates filaments. These results strongly indicate that the anti-K8 molecules had been delivered and were bound to K8 proteins assembled as intermediate filaments.

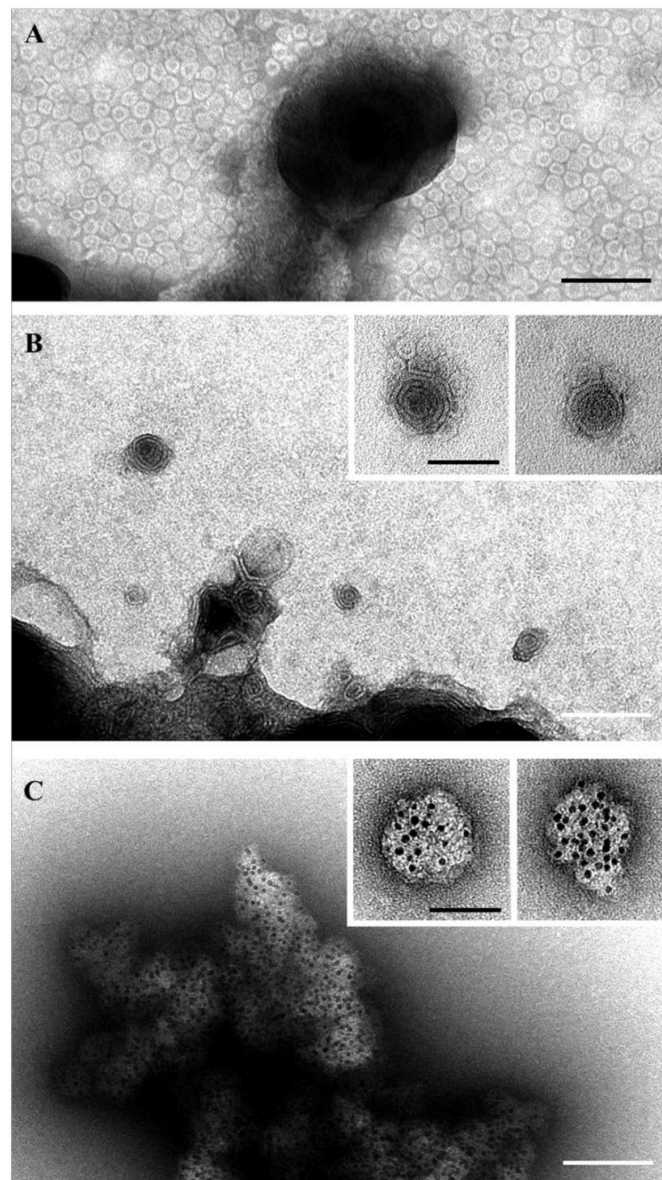


*Figure 5: Visualization of decorated filaments by anti-K8 using correlative light and electron microscopy.*

*To visualize delivered anti-K8 targeting the filaments, both fluorescence and transmission electron microscopies were performed on the exact same cell using an antibody coupled to nanogold and AlexaFluor 594 (FNG-A594-Au) against anti-K8. (A) Fluorescence image of cell-delivered anti-K8. (B) Immunofluorescence of anti-K8 using FNG-A594-Au. (C) A TEM section of the same cell. This section shows the cell portion close to the culture support. (D, F) Enlargements corresponding to the three ROI (white squares 1, 2 and 3 respectively in A). (D-E) TEM images showing gold particles overlapping the fluorescence signal of filaments in ROI 1 and 2 respectively. (F) High magnification TEM of ROI 3 marked in (A). White arrows designed ~8 nm diameter filaments. Scale bars are 10µm (A-B), 400nm (C), 200nm (D, E and inset) and 150nm (F).*

**Characterization of DOPRI/anti-K8 complexes using both TEM and cryoTEM**

To understand the mechanism of action of DOPRI, we first characterized the morphology of DOPRI and DOPRI/anti-K8 complexes using different complementary methods of electron microscopy. Negative staining TEM was used to see all objects composing the mixture because cryoTEM preferentially retains large objects and excludes small objects. CryoTEM allows the study of the structure of objects that are unresolved by negative staining. TEM and cryoTEM observations revealed that pure DOPRI solution contained small unilamellar and large multilamellar liposomes (Figures 6A, 7A and 7B). Small liposomes exhibited a diameter of about 15 and 30 nm when observed by cryoTEM and by TEM respectively. Unlike cryoTEM, TEM observations were performed with a plain carbon film enabling the adsorption and the flattening of the vesicles providing a basic explanation for the difference in size. DOPRI/anti-K8 complexes formed isolated multilamellar liposomes, with a 25-50 nm diameter range (inset Figure 6B) and also very large multilamellar aggregates (Figure 6B) that were clearly visible by cryoTEM (Figures 7C and 7D). Small liposomes were tightly packed together and attached to large multilamellar vesicles (white arrow Figure 7C). At the periphery of multilamellar vesicles, some extra densities were visible likely corresponding to anti-K8 molecules (black arrow Figure 7C). For a better characterization of anti-K8 attachment to DOPRI liposome, immunogold labelling using protein A coupled with 5 nm colloidal gold particles revealed that small (50-80 nm) and large DOPRI complexes were labeled with gold particles at their surfaces (Figure 6C). This result suggests that anti-K8 molecules are attached to the surface of DOPRI liposomes. Similar interactions have been previously observed with another aminoglycoside formulation [5].



*Figure 6 : TEM images of DOPRI and DOPRI/anti-K8.*  
*(A) Pure DOPRI solution contains small and large liposomes. (B) DOPRI/anti-K8 complexes. Inset: Enlargement of small vesicles. (C) DOPRI/anti-K8 complexes labelled with protein A coupled to colloidal gold particles. Inset: Enlargement of small labelled vesicles. Scale bars: 100nm and 50nm (inset).*



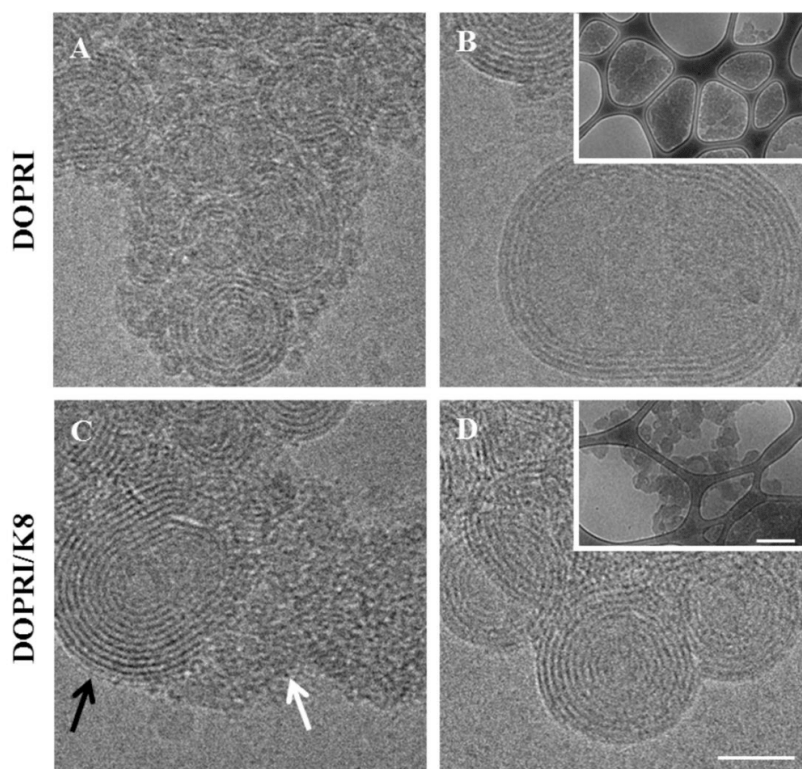


Figure 7 : CryoTEM images of pure DOPRI and DOPRI/anti-K8 complexes. (A-B) Small and large multilamellar liposomes are visible with pure DOPRI. Inset: Large field of view. (C-D) Large aggregates of DOPRI/anti-K8 complexes are composed of multilamellar and tightly packed small vesicles (white arrow). Densities at the periphery of multilamellar vesicles correspond to anti-K8 molecules (black arrow). Inset: Large field of view. Scale bars 50nm and 0.5 $\mu$ m (inset).

### Characterization of anti-K8 binding to DOPRI by ATR-FTIR

Polarized ATR-FTIR provides information on the secondary structures of proteins and on their orientation with respect to the lipid membrane [10], it is therefore a suitable method to get more details on the interaction of anti-K8 with DOPRI lipid. The formation and the organization of DOPRI bilayer on germanium crystal was monitored by the dichroic ratio ( $R_{ATR}$ ) of the  $\nu_{s}CH_2$  band at 2853  $cm^{-1}$  and the absorbance of the  $\nu_{as}CH_2$  at 2925  $cm^{-1}$ , respectively (Figure 8A, blue spectrum). A single DOPRI supported lipid bilayer was formed with some disorder in the chain. Addition of anti-K8 led to two additional absorption bands in the amide I and amide II regions (1700 to 1500  $cm^{-1}$ ) indicative of interactions between anti-

K8 and DOPRI bilayer (Figure 8A, red spectrum). The position and the dichroic ratio of lipid bands (range 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ ) were not affected by this adsorption. Therefore our data indicate that, the anti-K8 interacts mainly with the lipid headgroup without a deep insertion in the lipid bilayer. Figure 8A (green spectrum) showed the ATR-FTIR spectrum diluted anti-K8. A small variation on the profile of the amide bands was observed likely due to the dilution process. The broad amide I that was observed on the lipid bilayer revealed the presence of many secondary structure elements (beta sheets,  $\alpha$ -helices turns, random coil). The release of anti-K8 from DOPRI complexes was assessed by modifying pH, ionic conditions and by adding anionic lipids. No significant effect on amide I and II regions was observed at pH 5.1 (Figure 8B) or at pH 3 (data not shown). A similar result was obtained in the presence of 1 M NaCl (data not shown). Thus, the mild acidic pH or high salt concentration did not induce the detachment of anti-K8 molecules from the DOPRI surface. This indicates that the DOPRI/anti-K8 complex is not dissociated by small variation of pH or ionic strength that may occur at the formulation or at the cell incubation steps. Interestingly, the addition of anionic lipids (Figure 8C) triggered a strong increase at 2800  $\text{cm}^{-1}$  suggesting the formation of coupled cationic lipids/anionic lipids. More importantly, a decrease at the amide I and II regions was measured suggesting the release of anti-K8. The binding of anionic lipid to single DOPRI lipid driven by electrostatic interactions enables almost a total release of anti-K8 molecules.



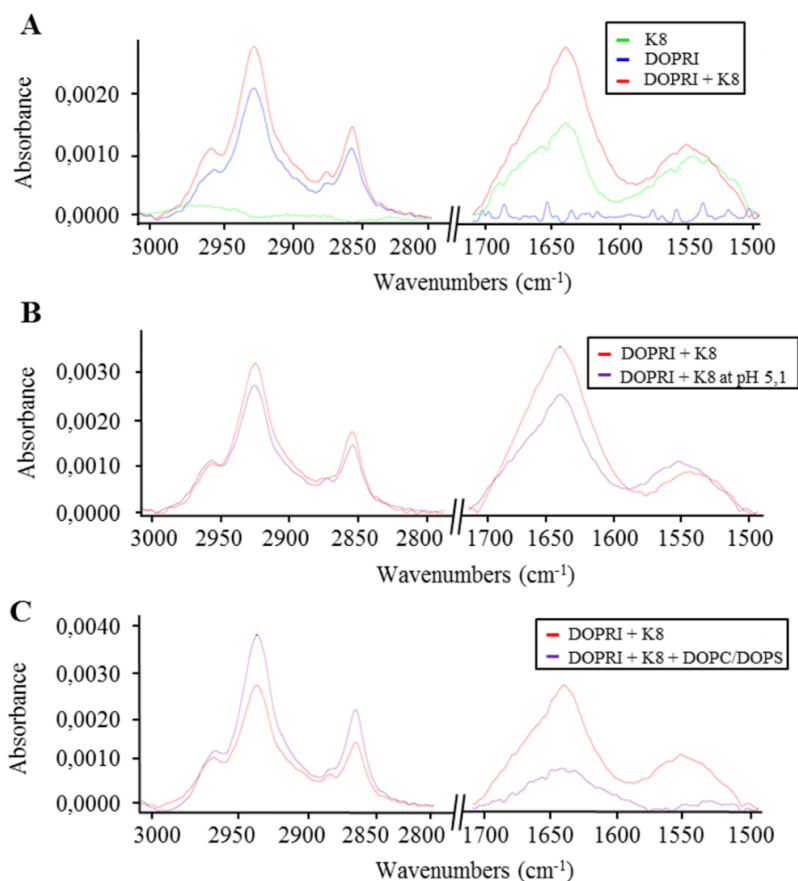


Figure 8 : ATR-FTIR analysis of anti-K8 attached to DOPRI supported bilayer. (A) P polarized spectra of anti-K8 in solution, DOPRI supported bilayer without and with anti-K8. (B) Effect of pH 5.1 on anti-K8 interaction with DOPRI. (C) Effect of anionic DOPC/DOPS liposomes on anti-K8 interaction with DOPRI inducing a partial release.

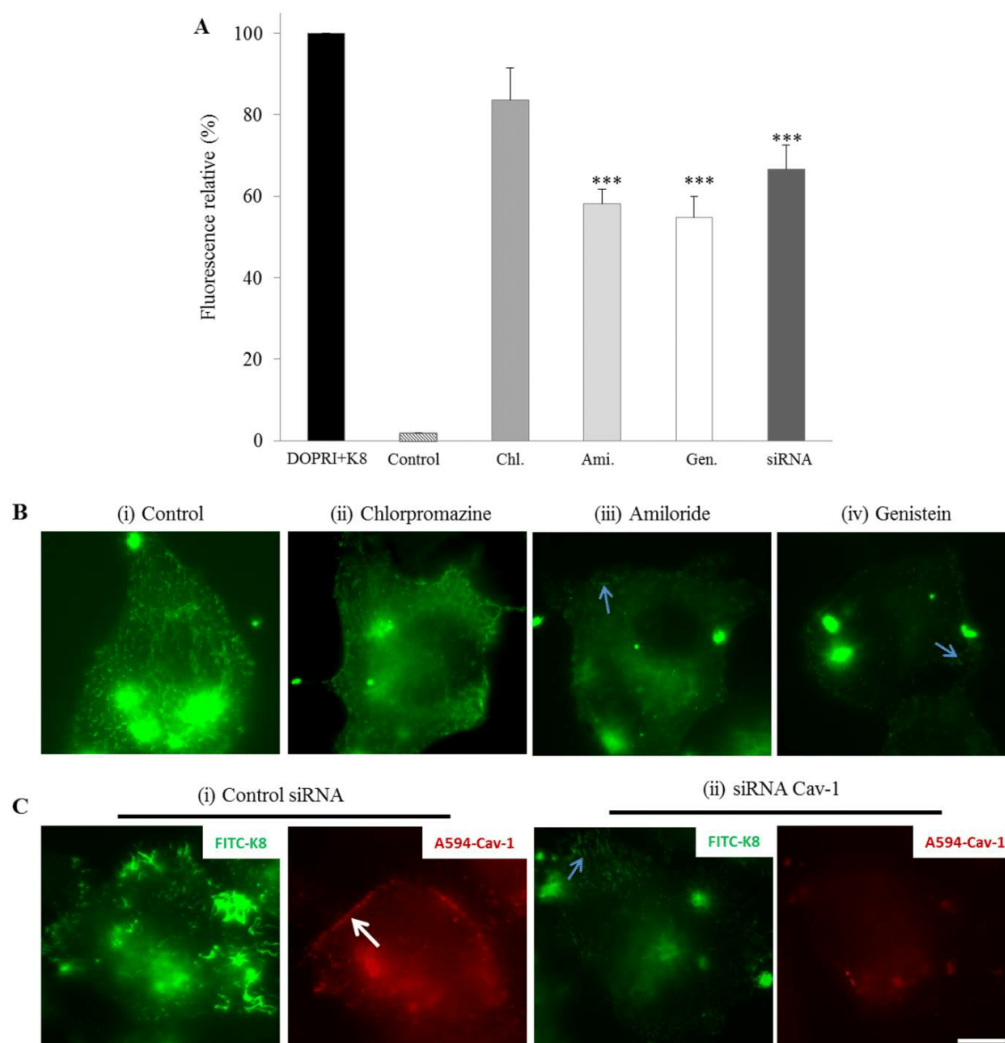
### Internalization pathways of DOPRI /anti-K8 complexes

Next, we investigated the internalization mechanisms of DOPRI/anti-K8 complexes. To explore the endocytosis pathways, classical chemical inhibitors of endocytosis, namely, chlorpromazine (clathrin-dependent endocytosis inhibitor), genistein (caveolin-dependent endocytosis inhibitor), or amiloride (macropinocytosis inhibitor) were used at 150  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  and 50 nM respectively, corresponding to suitable concentrations as determined by cell viability assays (data not shown). In addition caveolin-dependent endocytosis was assessed

using gene silencing Cav-1 which is the main structural protein of caveolae. DOPRI/anti-K8 complexes were incubated for 4 hours on pretreated cells with chemical inhibitors. Cells were analyzed by flow cytometry (Figure 9A).

DOPRI/anti-K8 internalization was significantly ( $p < 0.01$ ) reduced by amiloride or genistein treatment, by 42% and 45%, respectively while the chlorpromazine treatment had almost no effect. Furthermore by using siRNA to knockdown Cav-1, DOPRI/anti-K8 internalization was decreased by 33% supporting the involvement of caveolin pathway. These results show that the cellular uptake of DOPRI/anti-K8 complexes involves both macropinocytosis and caveolin-mediated endocytosis.

In order to correlate the involvement of these two internalization pathways with the labelling of the filaments, cells subjected to inhibitor treatments and siRNA Cav-1 silencing were also analyzed by fluorescence microscopy (Figures 9B and 9C). The majority of chlorpromazine-treated cells (about 53 % of observed cells) exhibited a filament labelling similar to that of control cells (Figure 9B). On the contrary, amiloride or genistein treatments markedly decreased the number of cells with labelled filaments (less than 24 % and 21 % of observed cells respectively). Similarly, among Cav-1 silenced cells (corresponding to an absence of AlexaFluor 594 signal), only 16 % of observed cells showed fluorescent filaments strengthening the role of the caveolin pathway in anti-K8 delivery (Figure 9C). Taken together these results indicate that both macropinocytosis and caveolin-mediated endocytosis are involved in the internalization of anti-K8 mediated by DOPRI and in the filament labeling with a major contribution for the caveolin pathway.



**Figure 9 : Internalization pathways involved in filament labelling by anti-K8.**  
 (A) Flow cytometry analysis of DOPRI/anti-K8 internalization within cells treated with various chemical inhibitors preventing endocytosis (chlorpromazine (Chl.), amiloride (Ami.) and genistein (Gen.)) and with siRNA Cav-1. Results are expressed as the mean percentage of three representative experiments  $\pm$  standard error of the mean. This was calculated by dividing the mean cell fluorescence intensity after complexes internalization in drug-treated cells by that of untreated cells. (B) Fluorescent images of cells submitted to these endocytosis inhibitors. For genistein and amiloride treatments, less filaments are labelled and exhibit a weaker signal (blue arrows). (C) For Cav-1 silenced cells, observed cells were negative to anti-Cav-1 labelling. In control siRNA experiment, caveolin is observed at the plasma membrane (white arrow). \*\*\* Significantly different from the control ( $P \leq 0.01$ ). Scale bar: 10 $\mu$ m.

## DISCUSSION

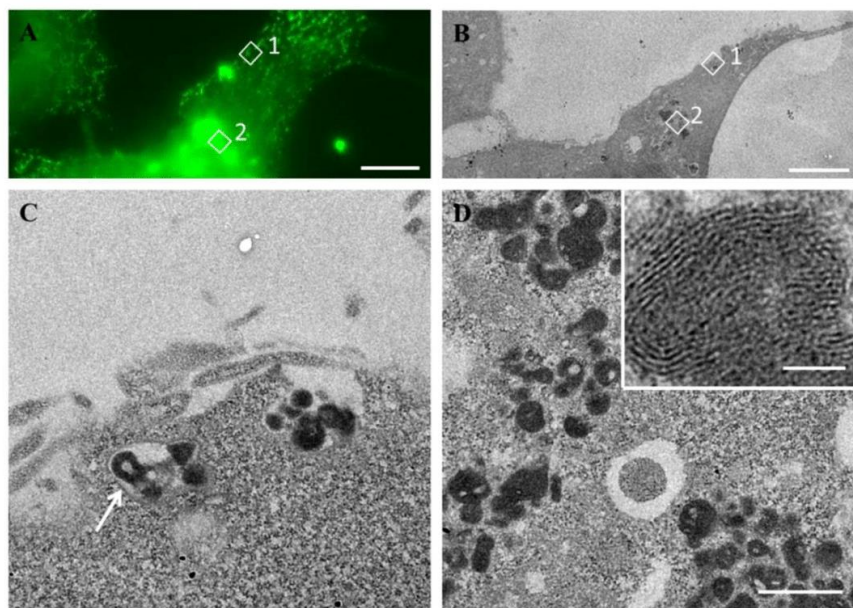
In this study, we demonstrate the capacity of a single aminosugar lipidic derivatives DOPRI to deliver antibodies into the cytosol of cells and study its mechanism of action. DOPRI allowed the delivery of functional anti-K8 to its intracellular target as indicated by the intense labelling of cytoskeletal filaments (Figure 2). Using a correlative approach combining fluorescence and electron microscopies, ~ 8 nm diameter fibers close to the plasma membrane were decorated with nanogold particles (Figure 5). The fibers targeted by anti-K8 molecules likely correspond to intermediate filaments that are 8-10 nm fibers size and have sub-plasma membrane and perinuclear localizations [11–13].

Based upon data from our experiments with endocytosis inhibitors, the delivery of DOPRI/anti-K8 through the plasma membrane involves endocytic pathways. The cellular uptake efficiency was significantly reduced ( $p < 0.01$ ) in the presence of inhibitors of caveolae-mediated endocytosis and macropinocytosis (Figure 9A). In contrast, chlorpromazine which prevents clathrin-mediated endocytosis did not affect DOPRI/anti-K8 internalization. Regardless of receptor recognition mechanisms, endocytosis is also size dependent [14–16]. Macropinocytosis forms vesicles called macropinosomes capable of internalizing large macromolecular complexes [17] [18]. On the contrary, caveolae are membrane invaginations forming vesicles with size of 60-80 nm in diameter [19] [20]. From our electron microscopy analyses, large ( $> 1\mu\text{m}$ ) and small (25-80 nm) DOPRI/anti-K8 complexes were formed (Figures 6 and 7). The size of the latter is compatible for endocytosis using the caveolin pathway and therefore supports our inhibitor experiments revealing the involvement of this pathway in DOPRI/anti-K8 complexes uptake.

Macropinocytosis and caveolin pathways were both involved in the internalization process suggesting that they would contribute to filament labelling. To evaluate their respective contribution, flow cytometry and fluorescence microscopy performed in the presence of

inhibitor indicate that both pathways participate in filament labelling (Figure 9). However, the caveolin pathway seems to play a major role as there was a lower number of cells exhibiting labelled filaments in the presence of caveolin inhibitor.

Macropinocytosis seems to be a less efficient mechanism to deliver antibodies. One can speculate that the release of anti-K8 from the large internalized complexes is less efficient. As supporting data we demonstrated that, many large fluorescent objects were observed (Figure 10).



*Figure 10 : DOPRI/anti-K8 complexes visualization in cells*  
 Images of cell-delivered anti-K8 by fluorescence microscopy (A) and TEM (B). (C-D) High magnification TEM of two ROIs (white squares 1 and 2 correspond to images C and D respectively). Dense electron structures correspond to multilamellar vesicles (white arrow in C). Inset: Enlargement of one of these multilamellar structures showing a lipid multilayer organization. Scale bars: 1 $\mu$ m (A-B), 500nm (C-D) and 50nm (inset).

TEM corresponding to large fluorescent objects that clearly showed multilamellar lipid structures (Figures 10C and 10D), suggesting that a large amount of anti-K8 remains trapped in macropinosomes-like vesicles. On the contrary, the caveolin pathway seems more suitable for anti-K8 release. Recently, caveolae-mediated endocytosis was described as a mechanism

to internalize cationic lipids with a lysine headgroup [21]. Inhibition studies showed that the cellular uptake mechanism of the complexes was mediated by caveolae and proteins were released from endosomes or caveosomes.

The mechanism triggered by DOPRI for endosomal escape is not known but our ATR-FTIR experiments indicate that antibodies are released from the cationic bilayer after the addition of anionic lipids (Figure 8). This result suggests the implication of a “flip-flop” mechanism of the anionic lipids of the endosomal membrane that could laterally diffuse and form charge-neutralized ion pairs more efficiently with DOPRI/antibody structure as described with lipid/nucleic acids complexes [22]. As a result, antibody would be released into the cytosol.

In summary, we demonstrate that DOPRI, a single lipoaminoglycoside-based delivery system allows a highly efficient intracellular delivery of anti-cytokeratin 8 antibodies. The mechanism of cellular uptake involves mainly caveolin-dependent endocytosis due to the formation of small homogeneous DOPRI/anti-K8 complexes. Finally, this single simple lipoaminoglycoside represents an important step toward the development of pharmaceutically acceptable synthetic delivery system for intracellular delivery of antibodies because DOPRI would be suitable for the delivery of other antibody molecules.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to Sylvie Poussard from for their technical assistances. This work has benefited from the facilities and expertise of the Biophysical and Structural Chemistry platform (BPCS) at IECB, CNRS UMS3033, Inserm US001, Bordeaux University <http://www.iecb.u-bordeaux.fr/index.php/fr/plateformestecnologiques>.

The authors acknowledge the cytometry platform of University of Bordeaux, VIB Bio Imaging Core platform (Ghent, Belgium) and Cordouan Technologies (Pessac, France). The authors thank In Cell Art (Nantes, France) for providing the various lipoaminoglycosides. We are also indebted to P. Lehn and J.-M. Lehn for their pioneer works related to the synthesis of cationic lipids used in this study and for their stimulating discussions and constant interest in this work. This work was realized in the context of the IHU-Cesti project which received French government financial support managed by the National Research Agency via the "Investment Into The Future" program ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. Laurence Dallet is supported by funds from IHU-Cesti (Investissement d'Avenir ANR-10-IBHU-005, Région Pays de la Loire et Nantes Métropole). This work has also benefited from the support by the ANR-CORF project. The FIB-SEM used for 3D volume electron microscopy at the VIB was purchased by a generous grant from the government of Flanders. This work has also benefited from the support by the ANR-CORF project coordinated by Dr Aleksander Edelman.

## References

- [1] A.M. Scott, J.D. Wolchok, L.J. Old, Antibody therapy of cancer, *Nat. Rev. Cancer*. 12 (2012) 278–287. doi:10.1038/nrc3236.
- [2] S. Guillard, R.R. Minter, R.H. Jackson, Engineering therapeutic proteins for cell entry: the natural approach, *Trends Biotechnol.* 33 (2015) 163–171. doi:10.1016/j.tibtech.2014.12.004.
- [3] A.L. Marschall, C. Zhang, A. Frenzel, T. Schirrmann, M. Hust, F. Perez, S. Dübel, Delivery of antibodies to the cytosol: Debunking the myths, *mAbs*. 6 (2014) 943–956. doi:10.4161/mabs.29268.
- [4] A. Edelman, Cytoskeleton and CFTR, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 52 (2014) 68–72. doi:10.1016/j.biocel.2014.03.018.
- [5] B. Chatin, M. Mével, J. Devallière, L. Dallet, T. Haudebourg, P. Peuziat, T. Colombani, M. Berchel, O. Lambert, A. Edelman, B. Pitard, Liposome-based Formulation for Intracellular Delivery of Functional Proteins, *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 4 (2015) e244. doi:10.1038/mtna.2015.17.
- [6] D. Habrant, P. Peuziat, T. Colombani, L. Dallet, J. Gehin, E. Goudeau, B. Evrard, O. Lambert, T. Haudebourg, B. Pitard, Design of ionizable lipids to overcome the limiting step of endosomal escape - Application in the intracellular delivery of mRNA, DNA and siRNA., *J. Med. Chem.* (2016). doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01679.
- [7] M. Mével, M. Sainlos, B. Chatin, N. Oudrhiri, M. Hauchecorne, O. Lambert, J.-P. Vigneron, P. Lehn, B. Pitard, J.-M. Lehn, Paromomycin and neomycin B derived cationic lipids: Synthesis and transfection studies, *J. Controlled Release*. 158 (2012) 461–469. doi:10.1016/j.jconrel.2011.12.019.
- [8] L. Desigaux, M. Sainlos, O. Lambert, R. Chevre, E. Letrou-Bonneval, J.-P. Vigneron, P. Lehn, J.-M. Lehn, B. Pitard, Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 16534–16539.
- [9] T. Colombani, P. Peuziat, L. Dallet, T. Haudebourg, M. Mével, M. Berchel, O. Lambert, D. Habrant, B. Pitard, Self-assembling complexes between binary mixtures of lipids with different linkers and nucleic acids promote universal mRNA, DNA and siRNA delivery, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* (2017). doi:10.1016/j.jconrel.2017.01.041.
- [10] S. Castano, B. Desbat, Structure and orientation study of fusion peptide FP23 of gp41 from HIV-1 alone or inserted into various lipid membrane models (mono-, bi- and multibi-layers) by FT-IR spectroscopies and Brewster angle microscopy, *Biochim. Biophys. Acta*. 1715 (2005) 81–95. doi:10.1016/j.bbamem.2005.07.008.
- [11] J. Block, V. Schroeder, P. Pawelzyk, N. Willenbacher, S. Köster, Physical properties of cytoplasmic intermediate filaments, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1853 (2015) 3053–3064. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.05.009.
- [12] E. Fuchs, K. Weber, Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease, *Annu. Rev. Biochem.* 63 (1994) 345–382.
- [13] H. Herrmann, H. Bär, L. Kreplak, S.V. Strelkov, U. Aebi, Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 562–573. doi:10.1038/nrm2197.
- [14] A. Benmerah, C. Lamaze, Clathrin-coated pits: Vive la différence?, *Traffic*. 8 (2007) 970–982. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00585.x.
- [15] L. Kou, J. Sun, Y. Zhai, Z. He, The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design, *Asian J. Pharm. Sci.* 8 (2013) 1–10. doi:10.1016/j.ajps.2013.07.001.



- [16] S. Zhang, J. Li, G. Lykotrafitis, G. Bao, S. Suresh, Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles, *Adv. Mater.* Deerfield Beach Fla. 21 (2009) 419–424. doi:10.1002/adma.200801393.
- [17] T.A. Gottlieb, I.E. Ivanov, M. Adesnik, D.D. Sabatini, Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells., *J. Cell Biol.* 120 (1993) 695–710. doi:10.1083/jcb.120.3.695.
- [18] L.J. Hewlett, A.R. Prescott, C. Watts, The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations, *J. Cell Biol.* 124 (1994) 689–703.
- [19] R.G. Parton, M. Hanzal-Bayer, J.F. Hancock, Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 787–796. doi:10.1242/jcs.02853.
- [20] R.G. Parton, K. Simons, The multiple faces of caveolae, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 185–194. doi:10.1038/nrm2122.
- [21] S.R. Sarker, R. Hokama, S. Takeoka, Intracellular Delivery of Universal Proteins Using a Lysine Headgroup Containing Cationic Liposomes: Deciphering the Uptake Mechanism, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 164–174. doi:10.1021/mp400363z.
- [22] O. Le Bihan, R. Chèvre, S. Mornet, B. Garnier, B. Pitard, O. Lambert, Probing the in vitro mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 1595–1609. doi:10.1093/nar/gkq921.









# Thèse de Doctorat

Laurence DALLET

## Caractérisation et compréhension du mécanisme des nanovecteurs pour la délivrance intracellulaire de macromolécules biologiques

Characterization and understanding of mechanism of nanovectors for the intracellular delivery of biological macromolecules

### Résumé

L'un des challenges dans la délivrance intracellulaire de macromolécules biologiques est le développement de vecteurs adaptés et efficaces. Des études précédentes ont identifiés les dérivés lipidiques d'aminoglycosides comme étant d'excellents candidats pour la délivrance d'acides nucléiques et récemment de protéines. La délivrance intracellulaire de protéines thérapeutiques représente une approche originale pour le traitement de pathologies car elles ont la capacité d'agir sur des voies de signalisation intracellulaire. Dans cette étude, nous avons identifié les relations entre les caractéristiques physico-chimiques des vecteurs et leur capacité à délivrer efficacement les molécules biologiques au sein des cellules. Pour y parvenir nous avons mis en œuvre une stratégie originale en étudiant les corrélations existantes par microscopie de fluorescence et électronique. Nous avons ainsi identifié un système micellaire à base d'aminoglycoside permettant la délivrance d'une protéine thérapeutique (anticorps K8-FITC) au sein de cellules vivantes. Les complexes lipide/anticorps sont internalisés par la voie macropinocytose et cavéole-dépendant (CvME) dont cette dernière est majoritaire. Ensuite, les complexes concentriques et multilamellaires (25 nm et 1 µm de diamètre) se retrouvent dans des vésicules intracellulaires et sont libérés par un mécanisme de « flip-flop ». La formation du couple lipides anioniques/cationiques permet le détachement de l'anticorps et sa libération dans le cytoplasme. Par microscopie corrélative et tomographie, il a été démontré que l'anticorps se distribuait dans l'ensemble de la cellule et restait fonctionnel, attesté par la fixation sur des filaments intermédiaires de cytokératine 8.

**Mots clés :** vecteur - délivrance intracellulaire - lipide cationique - mécanisme - microscopie corrélative - endocytose - cryo-MET

### Abstract

One of the challenges in the intracellular delivery of biological macromolecules is the development of suitable and efficient vectors. Previous studies have identified lipid derivatives of aminoglycosides as excellent candidates to the delivery of nucleic acids and recently proteins. The intracellular delivery of therapeutic proteins represents an original approach for the treatment of pathologies because they have the capacity to act on intracellular signaling pathways. In this study, we identified the relationships between physico-chemical characteristics of vectors and their ability to efficiently deliver biological molecules within cells. To achieve this, we have implemented an original strategy by studying the existing correlations by fluorescence and electron microscopy. We have thus identified an aminoglycoside-based micellar system allowing the delivery of a therapeutic protein (K8-FITC antibody) within living cells. The lipid/antibody complexes are internalized by the macropinocytosis and caveolae-dependent pathway (CvME), of which the latter is the majority. Then, the concentric and multilamellar complexes (25 nm and 1 µm in diameter) are found in intracellular vesicles and are released by a "flip-flop" mechanism. The formation of the anionic/cationic lipid couple allows detachment of the antibody and its release into the cytoplasm. By correlative microscopy and tomography, it was demonstrated that the antibody was distributed throughout the cell and remained functional, ascertained by the fixation on intermediate filaments of cyokeratin 8.

**Key Words:** vector - intracellular delivery - cationic lipid - mechanism - correlative microscopy - endocytosis - cryo-TEM