

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

---

**Transports intracellulaires ciblés de  
macromolécules biologiques**

---

**THESE DE DOCTORAT**

**Ecole doctorale BIOLOGIE-SANTE de NANTES**

**Discipline** : Sciences de la vie et de la santé

**Spécialité** : Biologie cellulaire et moléculaire

*présentée  
et soutenue publiquement par*

***Emilie LETROU-BONNEVAL***

Le 05 Février 2009, devant le jury ci dessous

<b><i>Rapporteurs</i></b>	<b>Dr. Jean-Luc COLL</b> , <i>Directeur de Recherche INSERM, Grenoble</i> <b>Dr. Olivier LAMBERT</b> , <i>Chargé de Recherche CNRS, Bordeaux</i>
<b><i>Examineurs</i></b>	<b>Pr. Pierre LEHN</b> , <i>Professeur à l'Université de Brest</i> <b>Dr. Jean-Claude MICHALSKI</b> , <i>Directeur de Recherche CNRS, Lille</i>
<b><i>Directeur de thèse</i></b> <b><i>Co-encadrante</i></b>	<b>Dr. Bruno PITARD</b> , <i>Directeur de Recherche CNRS, Nantes</i> <b>Dr. Corinne ANDRE</b> , <i>Maître de conférence à l'Université de Nantes</i>

## SOMMAIRE

---

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>1</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTE DES SCHEMAS</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>8</b>
<b>ABBREVIATIONS</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>15</b>
<b>GENERALITES</b> .....	<b>23</b>
1. <i>Le transfert de gène</i> .....	23
1.1. <i>Les vecteurs viraux</i> .....	23
1.2. <i>Les vecteurs non viraux</i> .....	24
2. <i>Les différentes étapes cellulaires impliquées dans le transfert de gène</i> .....	60
2.1. <i>Les différentes voies d'internalisation</i> .....	61
2.2. <i>L'échappement endosomal des complexes vecteur synthétique/ADN</i> .....	66
2.3. <i>Le transport cytosolique et l'entrée nucléaire</i> .....	70
3. <i>Développement de nouveaux systèmes synthétiques pour un transfert de gène ciblé</i> .....	73
3.1. <i>Ciblage passif</i> .....	73
3.2. <i>Ciblage actif</i> .....	82
<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>98</b>
1. <i>Plasmides</i> .....	98
2. <i>Les copolymères à blocs</i> .....	98
2.1. <i>Les copolymères à blocs amphiphiles non ioniques</i> .....	98
2.2. <i>Les copolymères à blocs amphiphiles ioniques</i> .....	98
3. <i>Glycosylation des extrémités distales des copolymères à blocs</i> .....	99
3.1. <i>Glycosylation enzymatique</i> .....	99
3.2. <i>Glycosylation chimique</i> .....	101
4. <i>Chromatographie d'exclusion stérique (CES)</i> .....	106
5. <i>Lipides cationiques</i> .....	106
6. <i>Formulation des lipoplexes</i> .....	107
6.1. <i>Formulation du système multimodulaire</i> .....	107
6.2. <i>Formulation de l'ADN avec les copolymères à blocs pour le transfert de gène dans le tissu pulmonaire</i> .....	107
7. <i>Caractérisation physico-chimique des lipoplexes</i> .....	107
7.1. <i>Mesure de la taille des complexes</i> .....	107
7.2. <i>Mesure de la fluorescence du BET en solution</i> .....	107
7.3. <i>Migration sur gel d'agarose</i> .....	108
7.4. <i>Cryo-microscopie à transmission (Cryo-TEM)</i> .....	108
8. <i>Caractérisation de taille des lipoplexes dans du milieu de transfection</i> .....	108
9. <i>Culture primaire d'hépatocytes</i> .....	108

10. Cultures cellulaires .....	109
11. Transfection cellulaire.....	109
12. Dosage de la luciférase par chimioluminescence.....	109
13. Formulation et transfection de l'ADN marqué au YOYO-1 .....	110
14. Visualisation du transfert de gène .....	110
15. Transfert de gène dans les poumons .....	111
16. Dosage de la protéine CAT par ELISA .....	111
17. Immunohistochimie.....	112
<b>RESULTATS.....</b>	<b>113</b>
<b>PARTIE 1 : SYNTHESE DES STABILISATEURS STERIQUES FONCTIONNALISES .....</b>	<b>114</b>
1. Les stabilisateurs stériques .....	114
2. Fonctionnalisation des copolymères à blocs non ioniques .....	115
2.1 Synthèse enzymatique .....	115
2.2 Synthèse chimique .....	118
3. Fonctionnalisation chimique des copolymères à blocs ioniques.....	120
3.1 Introduction d'un résidu galactosyle .....	120
3.2 Introduction d'un résidu mannosyle .....	121
4. Caractérisation chimique des copolymères à blocs fonctionnalisés .....	122
4.1. Taux d'incorporation des résidus glycosyles .....	123
4.2. Analyses des stabilisateurs stériques fonctionnalisés par CES.....	125
<b>PARTIE 2 : CONCEPTION D'UN NOUVEAU SYSTEME SYNTHETIQUE MULTIMODULAIRE GALACTOSYLE POUR LA DELIVRANCE SPECIFIQUE D'ACIDES NUCLEIQUES DANS DES HEPATOCYTES PRIMAIRES DE RAT.....</b>	<b>128</b>
A. Formulation du système multimodulaire.....	128
1. Lipides cationiques .....	128
2. Diagramme de stabilité colloïdale .....	128
3. Stabilisation colloïdale des lipoplexes de la zone B.....	131
3.1. Stabilisation colloïdale des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN.....	131
3.2. Stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN.....	133
3.3. Stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP-ADN.....	136
4. Récapitulatif des systèmes multimodulaires formés .....	139
5. Influence du rapport de charge BGTC/DOPE-ADN .....	141
6. Influence du milieu de transfection in vitro.....	143
7. Morphologie du système BGTC/DOPE-ADN/stabilisateurs stériques .....	144
B. Efficacité de transfection in vitro des systèmes multimodulaires galactosylés .....	146
1. Transfection des hépatocytes primaires in vitro.....	146
1.1. Efficacité de transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal.....	146
1.2. Efficacité de transfection des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/F108-gal.....	149
1.3. Efficacité de transfection des lipoplexes DOSP-ADN/704-gal .....	151
2. Transfection in vitro de lignées d'hépatocytes en culture .....	154
3. Cytotoxicité des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal .....	156
4. Spécificité du ciblage des systèmes multimodulaires galactosylés .....	157
4.1. Compétition des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal.....	157
4.2. Compétition entre les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal.....	159
4.3. Transfection in vitro des cellules Cos7 .....	161

4.4. Inhibition de l'endocytose spécifique .....	162
5. Distribution des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal .....	164
<b>PARTIE 3 : DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE CLASSE DE VECTEURS POUR LE TRANSFERT DE GENE DANS LE TISSU PULMONAIRE.....</b>	<b>168</b>
1. Le système multimodulaire galactosylé BGTC/DOPE-ADN/F108-gal .....	170
2. Les copolymères à blocs galactosylés .....	172
2.1 Les copolymères à blocs non ioniques galactosylés .....	172
2.2 704-gal, copolymère à blocs ionique galactosylé .....	174
3. Cinétique de l'expression du gène rapporteur .....	177
4. Délivrance des copolymères à blocs galactosylés par Microsprayer® .....	178
<b>DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION.....</b>	<b>180</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>196</b>
<b>ARTICLE 1</b>	
<b>ARTICLE 2</b>	
<b>ARTICLE 3</b>	
<b>ARTICLE 4</b>	

## LISTE DES SCHEMAS

---

Schéma 1: Représentation schématique des stabilisateurs stériques. Copolymères à blocs amphiphiles non ioniques et ioniques .....	114
Schéma 2: Synthèse enzymatique des stabilisateurs stériques galactosylés par l'activité de transgalactosylation de la $\beta$ -galactosidase d' <i>A. Oryzae</i> . .....	115
Schéma 3: Synthèse enzymatique des stabilisateurs stériques glucosylés par l'activité de transglucosylation de la $\beta$ -glucosidase d'Amande. ....	116
Schéma 4: Synthèse chimique des stabilisateurs stériques galactosylés .....	118
Schéma 5: Mannosylation chimique du F108. ....	119
Schéma 6: Galactosylation chimique du 704. ....	121
Schéma 7: Mannosylation chimique du 704. ....	122

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1: Tableau récapitulatif des structures obtenues après formulation de l'ADN à différents lipides cationiques. ....	38
Tableau 2: Caractéristiques physico-chimiques de certains poloxamères à 37°C. ..	54
Tableau 3: Exemple de différents ligands classiquement utilisés pour le transfert de gène ciblé. ....	83
Tableau 4: Taux d'incorporation des résidus glycosyles tétraacétylés ( $Ac_4$ ) et déacétylés ainsi que les constantes de couplage du H-1 anomère de l'ensemble des stabilisateurs stériques fonctionnalisés par voie enzymatique (*) ou par voie chimique. ....	125
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des caractérisations physico-chimiques de l'ensemble des systèmes multimodulaires créés. ....	140

## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1: Structure schématique des lipides cationiques.....	25
Figure 2: Structure chimique de la DOPE.....	26
Figure 3: Structure chimique du DOTMA et du DOTAP.....	26
Figure 4: Structure chimique du DOGS et du DOSPA.....	28
Figure 5: Structure chimique des dérivés lipidiques d'aminoglycosides. ....	29
Figure 6: Structure chimique des dérivés du cholestérol.....	31
Figure 7: Stabilité colloïdale des lipoplexes lipopolyamine-ADN.....	34
Figure 8: Complexation de l'ADN au sein des lipoplexes. ....	35
Figure 9: Représentation schématique des structures tubulaires et bilamellaires des complexes lipide cationique/ADN .....	37
Figure 10: Représentation schématique de la phase multilamellaire et de la phase hexagonale inversée proposée pour les lipoplexes DOTAP/DOPE-ADN.....	37
Figure 11: Cryo-TEM des lipoplexes de BGTC/DOPE-ADN.....	39
Figure 12: Structure chimique du PEI branché et linéaire.....	41
Figure 13: Structure chimique de la PLL.....	42
Figure 14: Schéma de la structure générale des dendrimères .....	43
Figure 15: Structure chimique des chitosans.....	44
Figure 16 : Mesures du potentiel zéta de différents polyplexes en fonction du rapport de charge.....	46
Figure 17: Visualisation des polyplexes PEI/ADN en fonction du milieu de formulation par microscopie électronique.....	47
Figure 18: Efficacité de transfection <i>in vitro</i> des PEI de haut poids moléculaire et de bas moléculaire complexés à l'ADN à différents rapports de charge.....	48
Figure 19: Visualisation des polyplexes PEI/ADN par microscopie à effet de force ..	49
Figure 20: Formation des « Toroids » en présence d'ADN.....	50
Figure 21: Représentation schématique et composition des copolymères à blocs ioniques .....	53
Figure 22: représentation schématique des poloxamères. ....	53
Figure 23 : Structure des copolymères à blocs selon la concentration critique CMC et la température critique micellaire CMT .....	54
Figure 24 : Transfert de gène dans divers organes à l'aide de copolymères à blocs .....	57
Figure 25: Expression du gène rapporteur et analyses histopathologiques de poumons de souris, après injection intratrachéale des complexes copolymères à blocs/ADN.....	58
Figure 26 : Les principales étapes du trafic intracellulaire des complexes vecteur synthétique/ADN.....	61
Figure 27: Représentation schématique de la phagocytose.....	62
Figure 28: Représentation schématique de la macropinocytose, de l'endocytose clathrine-dépendante et cavéole-dépendante ainsi que de la micropinocytose.....	63

<i>Figure 29: Schéma détaillé de l'endocytose clathrine-dépendante induite par la reconnaissance ligand-récepteur.....</i>	<i>64</i>
<i>Figure 30: Mécanisme d'échappement endosomal des lipoplexes.....</i>	<i>68</i>
<i>Figure 31: Mécanisme d'échappement endosomal des polyplexes par l'effet "éponge à protons" .....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 32: Effet des polymères hydrophiles sur la biodisponibilité des complexes vecteur synthétique/ADN.....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 33: Représentation schématique des complexes PEG-lipoplexes en fonction de la méthode d'incorporation des molécules de PEG, par pré-PEGylation ou par post-PEGylation.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 34: Fixation du ligand avant ou après la formation des complexes vecteurs synthétique/ADN.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 35: Cristallographie du domaine CRD de la sous-unité H-1. ....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 36: Cinétique de la glycosylation enzymatique catalysée par la <math>\beta</math>-glucosidase d'Amande .....</i>	<i>117</i>
<i>Figure 37: spectre RMN <math>^1\text{H}</math> du 704galAc<sub>4</sub> .....</i>	<i>124</i>
<i>Figure 38: Chromatogrammes CES du F108, F108-gal, F68 et F68-gal. ....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 39: Complexation de l'ADN et stabilité colloïdale des lipoplexes lipide cationique/ADN .....</i>	<i>130</i>
<i>Figure 40: Complexation de l'ADN et stabilisation colloïdale des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN en présence de F108-gal ou de F108.....</i>	<i>132</i>
<i>Figure 41: Complexation de l'ADN et stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN en présence de F108-gal ou de F108.....</i>	<i>133</i>
<i>Figure 42: Complexation de l'ADN et stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN en présence de 704-gal ou de 704.....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 43: Complexation de l'ADN et stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP-ADN en présence de stabilisateurs stériques galactosylés ou non galactosylés.....</i>	<i>138</i>
<i>Figure 44: Influence du rapport de charge BGTC/DOPE-ADN.....</i>	<i>142</i>
<i>Figure 45: Stabilité colloïdale des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal en présence de milieu de transfection .....</i>	<i>143</i>
<i>Figure 46: Visualisation des lipoplexes multimodulaires par cryo-TEM. ....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 47: Efficacité de transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2 en présence de stabilisateurs stériques de nature chimique différente.....</i>	<i>147</i>
<i>Figure 48: Efficacité biologique des lipoplexes galactosylés en fonction du rapport de charge (+/-) et de la quantité d'ADN .....</i>	<i>148</i>
<i>Figure 49: Efficacité de transfection des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/F108-gal et DOSP/DOPE-ADN/F108 en fonction du rapport stabilisateurs stériques/ADN (w/w)..</i>	<i>150</i>
<i>Figure 50: Efficacité de transfection des lipoplexes DOSP-ADN/704-gal et DOSP-ADN/704 en fonction du rapport stabilisateurs stériques/ADN (w/w).....</i>	<i>153</i>
<i>Figure 51: Efficacité de transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2 en présence de F108-gal ou de F108 à différents rapports F108/ADN (w/w) .....</i>	<i>155</i>
<i>Figure 52: Test MTT, 24h après transfection des HuH7. ....</i>	<i>157</i>

<i>Figure 53: Transfection spécifique in vitro des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal</i>	158
<i>Figure 54: Compétition entre les lipoplexes galactosylés au niveau du ASPGR. ....</i>	160
<i>Figure 55: Transfection in vitro des cellules Cos7</i>	162
<i>Figure 56: Ciblage spécifique des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal.....</i>	163
<i>Figure 57: Visualisation des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal, BGTC/DOPE-ADN/F108, et BGTC/DOPE-ADN au rapport de charge 4.....</i>	165
<i>Figure 58: Expression de la <math>\beta</math>-galactosidase et de la GFP après transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal, BGTC/DOPE-ADN/F108 et BGTC/DOPE-ADN au rapport de charge 4.....</i>	166
<i>Figure 59: Structure chimique du Lac-PEI.....</i>	169
<i>Figure 60: Expression du gène rapporteur de la CAT dans des poumons de souris, après injection en intratrachéale des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et BGTC/DOPE-ADN/F108</i>	171
<i>Figure 61: Activité de la CAT après injection en intratrachéale de 100 <math>\mu</math>g d'ADN formulé au F68-gal et au F68 non substitué</i>	172
<i>Figure 62: Activité de la CAT après injection en intratrachéale de 100 <math>\mu</math>g d'ADN formulé au F108-gal et au F108 non galactosylé</i>	173
<i>Figure 63: Activité de la CAT après injection en intratrachéale de 100 <math>\mu</math>g d'ADN formulé au 704-gal et au 704 parent</i>	174
<i>Figure 64: Comparaison de l'efficacité de transfection des copolymères à blocs galactosylés non ioniques ou ioniques, 48h après injection intratrachéale.....</i>	175
<i>Figure 65: Cinétique d'expression de la CAT après injection intratrachéale des complexes 704gal/ADN et 704/ADN.....</i>	177
<i>Figure 66: Expression et localisation du gène rapporteur dans des poumons de souris 48h après injection par Microsprayer®.</i>	178



## ABBREVIATIONS

---

+/-	rapport de charges positives/charges négatives
704	poloxamine 704 ([poly(éthylèneoxyde) <sub>13</sub> -poly(propylèneoxyde) <sub>30</sub> ] <sub>2</sub> -éthylènediamine-[poly(éthylèneoxyde) <sub>13</sub> -poly(propylèneoxyde) <sub>30</sub> ] <sub>2</sub>
704-gal	704 galactosylé (1-O-704-β-D-galactopyranoside)
704-galAc <sub>4</sub>	2,3,4,6-tetra-O-acétyl-1-O-704-β-D-galactopyranoside
704-man	704 mannosylé (1-O-704-α-D-galactopyranoside)
704-manAc <sub>4</sub>	2,3,4,6-tetra-O-acétyl-1-O-704-α-D-mannopyranoside
ADN	acide désoxyribonucléique
AFM	microscopie à force atomique
ASPGR	Récepteur aux asialoglycoprotéines
BET	bromure d'éthidium
BF <sub>3</sub> OEt <sub>2</sub>	Ethérate de trifluorure de bore
BGSC	(bis(guanidinium)-spermine-cholesterol)
BGTC	(bis(guanidinium)-tren-cholesterol)
CAT	enzyme Chloramphénicol-Acéthyl-Transférase
CES	chromatographie d'exclusion stérique
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	dichlorométhane
CMC	concentration critique micellaire
CMT	température critique micellaire
COS-7	fibroblastes de rein de singe vert d'Afrique
cryo-TEM	cryo-microscopie électronique à transmission
DC-Chol	(3[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]cholesterol)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DOGS	dioctadécylamine-glycine-spermine
DOPC	dioléoylphosphatidylcholine
DOPE	di-oléoylphosphatidyléthanolamine
DOSK	DiOleylamine A-Succinyl-Kanamycine
DOSN	DiOleylamine A-Succinyl-Neomycine
DOSP	DiOleylamine A-Succinyl-Paromomycine
DOSPA	2,3-dioléoxy-N-2-(spermine-carboxamido)éthyl-N,N-diméthyl-1-propanammonium
DOST	DiOleylamine A-Succinyl-Tobramycine
DOTAP	chlorure de 1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium-propane
DOTMA	chlorure de N-[1-(2,3-dioléoxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium

DSPE-PEG	distéaryl-phosphoéthanolamine-poly(éthylène)glycol
ELISA	« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay »
EO	éthylène oxyde
EPO	érythropoïétine murine
F108	pluronic F108 (poly(éthylèneoxyde) <sub>127</sub> -poly(propylèneoxyde) <sub>50</sub> -poly(éthylèneoxyde) <sub>127</sub> )
F108-gal	F108 galactosylé (1-O-F108-β-D-galactopyranoside)
F108-galAc <sub>4</sub>	2,3,4,6-tetra-O-acétyl-1-O-F108-β-D-galactopyranoside
F108-glc	F108 glucosylé (1-O-F108-β-D-glucopyranoside)
F108-man	F108 mannosylé (1-O-F108-α-D-mannopyranoside)
F108-manAc <sub>4</sub>	2,3,4,6-tetra-O-acétyl-1-O-F108-α-D-mannopyranoside
F68	pluronic F68 (appelé Lutrol®)
F68-gal	F68 galactosylé (1-O-F68-β-D-galactopyranoside)
F68-galAc <sub>4</sub>	2,3,4,6-tetra-O-acétyl-1-O-F68-β-D-galactopyranoside
F68-glc	F68 glucosylé (1-O-F68-β-D-galactopyranoside)
GFP	protéine fluorescente en vert (« Green Fluorescent Protein »)
HE	phase hexagonale inversée
HepG2	cellules hépatiques humaines cancéreuses
Hep 3B	cellules d'hépatocytes humains
HuH7	cellules d'hépatocytes humains
IHH	cellules d'hépatocytes humains immortalisés
L61	pluronic L61
L64	pluronic L64 (appelé également PE6400)
Lutrol®	(poly(éthylèneoxyde) <sub>75</sub> -poly(propylèneoxyde) <sub>13</sub> -poly(éthylèneoxyde) <sub>75</sub> )
MTT	3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium
N/P	rapport azotes/phosphates
NaCl	chlorure de sodium
P123	pluronic P123
PAMAM	polyamidoamine
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	phosphatidylcholine
pCIK-Cat	plasmide codant pour le gène rapporteur de la CAT
pCMV	promoteur précoce du cytomégalovirus humain
pCMV-GFP	plasmide codant pour le gène rapporteur de la GFP
pCMV-LacZ	plasmide codant pour le gène rapporteur de la β-Galactosidase
pCMV-luc	plasmide codant pour le gène rapporteur de la Luciférase
pQE30	plasmide vide

PE6400	(poly(éthylèneoxyde) <sub>13</sub> -poly(propylèneoxyde) <sub>30</sub> -poly(éthylèneoxyde) <sub>13</sub> )
PEG	poly(éthylène-glycol)
PEI	polyéthylène-imine
PEO	poly(éthylène oxyde)
PLL	polylysine
PO	propylène oxyde
PPO	poly(propylène oxyde)
RLB	Reporter Lysis Buffer
SAXS	« Small Angle X-Rays Scattering »
SFM	« Scanning Force Microscopy »
SVF	Sérum de Veau Foetal
SV40	promoteur précoce du virus simien SV40
TAE	tampon Tris-Acétate-EDTA
THF	Tétra-hydroflurane
Tyrode 2X	solution composée de NaCl 280 mM, KCl 12 mM, CaCl <sub>2</sub> 6 mM, MgCl <sub>2</sub> 4 mM, HEPES 20 mM et Glucose 20 mM
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
YOYO-1	sonde fluorescente s'intercalant entre les bases d'ADN

# **I - INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

---

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

Les recherches dans le domaine de la thérapie génique visaient surtout à corriger les maladies héréditaires, telles que l'hémophilie, la mucoviscidose ou les myopathies, mais les espoirs suscités par cette nouvelle technique se sont vite répandus aux maladies acquises, tels que les cancers, les maladies neurodégénératives ou les pathologies infectieuses (hépatites, SIDA). En effet, ces pathologies font aujourd'hui l'objet de nombreux essais cliniques mais les résultats significatifs sont peu nombreux. Le décès d'un patient aux Etats-Unis en 1999 au cours d'un protocole de thérapie génique (Carmen IH, 2001) a remis en cause la faisabilité de tels traitements. Mais en 2000 le Dr. Fisher et son équipe a réalisé un protocole clinique qui a permis la guérison d'enfants atteints d'un déficit immunitaire sévère lié à l'X (« bébés bulles ») (Cavazzana-Calvo M *et al.*, 2001; Fischer A *et al.*, 2001). Néanmoins, les derniers essais ont montré les limites de cette thérapie car certains enfants ont développé des leucémies à la suite de l'activation d'oncogènes provoquée par l'insertion du transgène (Gene Therapy trials. <http://www.search.wiley.com>).

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

Si le principe de la thérapie génique repose sur le transfert de gène thérapeutique dans des cellules cibles, sa mise en application est beaucoup plus complexe car l'ADN franchit difficilement les membranes plasmiques des cellules. En effet, les acides nucléiques sont des molécules polyanioniques hydrophiles de grande taille qui ne sont pas aptes à traverser les membranes cellulaires, constituées d'une bicouche lipidique hydrophobe et chargées négativement (Farhood, H. *et al.*, 1992;

Felgner PL *et al.*, 1987). D'où la nécessité d'utiliser différentes méthodes de vectorisation pour diminuer cette densité de charge négative et faciliter ainsi le passage à travers les membranes cellulaires. Le transfert de gène repose donc essentiellement sur la mise au point de vecteurs efficaces pour le transport des acides nucléiques au sein des cellules cibles.

Le vecteur constitue un élément clé de la thérapie génique. Son rôle est décisif car il interagit avec les molécules d'acides nucléiques permettant ainsi de les vectoriser dans un nombre suffisant de cellules cibles puis de les transporter jusqu'au noyau de la cellule ce qui correspond à des étapes importantes pour l'efficacité du traitement thérapeutique. La vectorisation d'acides nucléiques nécessite d'abord d'isoler, de cloner ou de synthétiser le gène d'intérêt thérapeutique ou d'autres types de molécules d'acides nucléiques.

Ensuite, le vecteur peut être administré selon trois méthodes différentes: La thérapie génique *ex-vivo* consiste à prélever sur le patient les cellules cibles, à les modifier génétiquement par transfert d'acides nucléiques, puis à les réintroduire chez le patient. Cette méthode est utilisée par exemple pour les cellules sanguines qui sont faciles à prélever et à réintroduire. Cependant, cette technique présente des limites pour les types cellulaires ne pouvant être ni facilement prélevés, ni efficacement réinjectés. La thérapie génique *in situ* consiste à injecter le vecteur complexé aux acides nucléiques directement au sein du tissu cible (injection intra-musculaire, intra-trachéale...). Quant à la thérapie génique *in vivo*, elle correspond à l'injection des complexes vecteur/acides nucléiques directement dans la circulation sanguine qui devront atteindre, via la circulation, les cellules cibles sans être reconnus par le système immunitaire. L'activité biologique générée par l'internalisation des acides nucléiques au sein des tissus cibles est ensuite déterminée. Il en est de même pour la toxicité et l'inflammation qui peuvent être engendrées par l'injection des complexes vecteur/acides nucléiques.

Actuellement on distingue deux grandes familles de systèmes de vectorisation d'acides nucléiques, les vecteurs synthétiques et les vecteurs viraux. Ces derniers possèdent de nombreux avantages en termes d'efficacité de transfection des acides nucléiques, cependant ils souffrent de sévères inconvénients. En effet, les vecteurs viraux sont souvent limités par la taille du transgène à véhiculer mais également par

les réactions immunitaires qu'ils engendrent ainsi que par leur pathogénicité. De plus, leur production est le plus souvent difficile et très coûteuse.

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

- Complexer les acides nucléiques de petites et de grandes tailles
- Protéger les acides nucléiques contre la dégradation des nucléases
- Simples d'administration
- Stables dans les fluides biologiques
- Cibler un type cellulaire spécifique
- Augmenter la transfection des acides nucléiques dans les cellules
- Transporter les acides nucléiques jusqu'au noyau
- Libérer les acides nucléiques dans la cellule
- Non toxiques, non immunogènes et non pathogènes

Les lipides et les polymères utilisés dans les systèmes de vectorisation sont capables de s'auto-assembler avec l'ADN pour former des complexes vecteur/ADN appelés respectivement, lipoplexes et polyplexes. Les propriétés physico-chimiques des complexes vecteur/ADN dépendent principalement du rapport de charge vecteur cationique/ADN (+/-), correspondant au nombre de moles de charges positives apportées par le vecteur cationique sur le nombre de moles de charges négatives apportées par les groupements phosphates de l'ADN, qui détermine la taille et la charge des complexes ainsi que le degré de complexation de l'ADN et donc l'efficacité de transfection (Bartreau B *et al.*, 2008, **ARTICLE 2**).

Cette relation structure/activité variant selon le type de vecteur utilisé, a permis de déterminer les paramètres indispensables à la formation des complexes vecteur/ADN mais également à la stabilité des complexes dans les fluides biologiques ainsi que leur capacité à être internalisés dans les cellules. Ainsi, leur

efficacité de transfection repose sur la forte densité de charges positives présente à la surface des complexes vecteur cationique/ADN qui leur permet d'être internalisés par interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires (Labat-Moleur F *et al.*, 1996; Mislick KA and Baldeschwieler JD, 1996). Cet excès de charges positives conduit certes à un transfert de gène efficace dans de nombreux types cellulaires mais il s'accompagne également d'une forte toxicité. De plus, dans le cadre d'un transfert de gène *in vivo*, ces complexes chargés positivement vont interagir de manière non spécifique avec les membranes plasmiques des cellules non ciblées ainsi qu'avec les composants de la matrice extracellulaire ce qui limitent leur efficacité de transfection *in vivo*.

Le développement de nouveaux systèmes capables de transporter spécifiquement *in vitro* et *in vivo* des acides nucléiques au sein d'un type particulier de cellules cibles représente donc aujourd'hui un enjeu majeur pour le transfert de gène.

Au cours de cette thèse, j'ai donc mis au point deux systèmes de transfert de gène dans le but de cibler spécifiquement des cellules hépatiques (*in vitro*) ou pulmonaires (*in vivo*).

### ***Transfert de gène ciblé dans des cellules d'hépatocytes primaires***

Jusqu'à maintenant, les systèmes de transfert de gène utilisés pour la délivrance d'acides nucléiques dans des cellules en culture sont principalement composés de vecteurs synthétiques cationiques. Cependant, leur efficacité dépend étroitement de la taille et du rapport de charge théorique, c'est-à-dire, du rapport de charges positives apportées par les vecteurs cationiques par rapport aux charges négatives de l'ADN. Il en résulte des complexes chargés positivement qui interagissent avec les charges négatives des membranes des cellules permettant ainsi leur internalisation par des voies d'endocytose non spécifique. Par conséquent, différentes équipes se sont intéressées au ciblage cellulaire via la reconnaissance d'un récepteur comme par exemple, le récepteur aux asialoglycoprotéines présents à la surface des hépatocytes, dont le ligand naturel correspond à des glycoprotéines portant un résidu galactose terminal. En effet, le foie est un organe important pour la thérapie génique car il est à l'origine de nombreuses maladies génétiques métaboliques comme l'hypercholestérolémie familiale, les maladies autosomales



liées à une déficience en récepteurs LDL (lipoprotéines de faible densité) mais aussi les hémophilies A et B qui sont dues à un déficit de production des facteurs de coagulation VII et IX (Lungwitz U *et al.*, 2005). Ainsi, de nombreux systèmes présentant un motif galactose distal ont été synthétisés à partir de vecteurs cationiques. Néanmoins, ces complexes ne sont pas à l'électroneutralité car les charges positives apportées par les vecteurs cationiques ne sont que partiellement masquées, ainsi, ces systèmes présentent toujours une activité résiduelle responsable de la transfection non spécifique d'une partie des cellules cibles. D'où la nécessité de créer un système multimodulaire composé d'abord d'un cœur d'ADN condensé par interactions électrostatiques à des molécules lipidiques et cationiques puis recouvert de stabilisateurs stériques comme les polyéthylèneglycols (PEG) portant à leurs extrémités des motifs de ciblage qui éviteront toute transfection non désirée. Notre système consiste à former des particules de petites tailles, proches de l'électroneutralité, stables colloïdalement et possédant un potentiel zéta proche de zéro capables de cibler naturellement le récepteur aux asialoglycoprotéines présents à la surface des hépatocytes. Pour cela, nous sommes partis d'une structure lipidique existante comme le BGTC/DOPE qui est couramment utilisée dans le cadre d'une transfection *in vitro* mais également d'une nouvelle famille de lipides cationiques, les dérivés lipidiques d'aminoglycosides (Desigaux L *et al.*, 2007, **ARTICLE 4**). Nous avons tout d'abord placé ces particules à un rapport de charge permettant l'électroneutralité pour s'affranchir des interactions non spécifiques avec les membranes cellulaires. Puis, elles sont ensuite stabilisées colloïdalement par ajout de copolymères à blocs amphiphiles qui ont été identifiés par notre équipe, comme une nouvelle classe de vecteurs synthétiques pour le transfert de gène dans différents organes. Cependant, ils jouent ici uniquement le rôle de stabilisateurs stériques. Ces copolymères à blocs ont ensuite été fonctionnalisés par synthèse enzymatique ou chimique afin de greffer à leurs extrémités des motifs galactose nécessaires au ciblage du récepteur aux asialoglycoprotéines.

Ce travail a permis de designer un système multimodulaire décoré de ligands pour cibler spécifiquement *in vitro* des hépatocytes primaires via le récepteur aux asialoglycoprotéines présents à leur surface par un mécanisme d'endocytose spécifique dépendant de la reconnaissance cellulaire ligand-récepteur. Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'un article (Letrou-Bonneval E *et al.*, 2008, **ARTICLE 1**).

### ***Transfert de gène in vivo dans des cellules pulmonaires***

Les différents vecteurs synthétiques actuellement utilisés pour le transfert de gène dans le tissu pulmonaire sont des lipides ou des polymères cationiques généralement très efficaces pour le transfert d'ADN dans des cellules en culture. Cependant pour des applications *in vivo*, ils se sont avérés toxiques et peu efficaces (Ferrari S *et al.*, 1997; McLachlan G *et al.*, 1995).

En effet, des études *in vivo* ont montré que la présence des lipides cationiques n'améliorait pas le transfert de gène dans les cellules épithéliales pulmonaires par rapport à l'ADN nu (Cockett MI, 1999; Knowles MR *et al.*, 1995). La forte densité de charges positives présente à la surface des complexes vecteur/ADN limite leur administration *in vivo*, en raison de la présence des constituants anioniques du sérum ou de la matrice extracellulaire qui s'agrègent très rapidement avec ces complexes (Kang HC *et al.*, 2005). Actuellement, le vecteur synthétique le plus efficace pour délivrer des molécules d'ADN dans les poumons est un polymère cationique, le PEI (Densmore CL *et al.*, 2000; Goula D *et al.*, 1998). Cependant, l'injection des complexes PEI/ADN induit une forte réaction inflammatoire dans les poumons qui se traduit par une importante obstruction des bronches ainsi que par un important infiltrat cellulaire au niveau de la zone péri-bronchiale et des vaisseaux sanguins pulmonaires (Ruiz FE *et al.*, 2001; Zabner J *et al.*, 1997). Le développement d'un système de vectorisation efficace, non invasif et non toxique est donc nécessaire pour cet organe car ce type de réaction inflammatoire observé avec le PEI n'est pas concevable dans un contexte pathologique comme la mucoviscidose où l'organe présente déjà d'importantes lésions. Notre équipe a donc récemment identifié une nouvelle classe de vecteurs synthétiques adaptés au transfert de gène dans les poumons, les copolymères à blocs amphiphiles ioniques et non ioniques (Desigaux L *et al.*, 2005). Ces copolymères à blocs sont des molécules formées de motifs hydrophiles composés d'oxydes d'éthylène (OE) ainsi que de motifs hydrophobes d'oxydes de propylène (OP), qui peuvent selon la température et la concentration s'associer pour former des phases auto-organisées. Ils présentent déjà forte efficacité de transfection au sein de nombreux organes, tels que le muscle squelettique ou le cœur. En effet, les copolymères à blocs sont capables de conduire à l'expression de gènes thérapeutiques tels que l'érythropoïétine après une injection en intramusculaire (Richard-Fiardo P *et al.*, 2008, **ARTICLE 3**). De plus, l'injection intratrachéale de ces vecteurs permet d'obtenir une forte expression du transgène

dans le tissu pulmonaire et notamment au niveau des cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires.

L'optimisation du potentiel de transfert de gène de ces nouveaux vecteurs synthétiques par greffage d'un ligand à leurs extrémités permettrait d'augmenter leur efficacité de transfection en ciblant spécifiquement des cellules pulmonaires. De nombreux vecteurs synthétiques ont ainsi été substitués par des résidus glycosidiques comme le lactose ou le mannose qui sont reconnus spécifiquement par des récepteurs membranaires de type lectines présents à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Midoux P *et al.*, 1993; Monsigny M *et al.*, 1998). Par conséquent, nous avons développé dans cette deuxième partie un nouveau système de vectorisation fonctionnalisé par un ligand de type galactose afin d'améliorer l'efficacité de transfection des copolymères à blocs natifs en transfectant un plus grand nombre de cellules épithéliales pulmonaires grâce aux résidus galactosyles.

Ce travail a permis de développer une nouvelle génération de vecteurs synthétiques adaptés au transfert de gène pulmonaire, capable d'améliorer significativement le potentiel de transfert de gène des vecteurs de la première génération quelque soit le mode d'administration dans des poumons de souris saines.

## **II - GENERALITES**

## GENERALITES

---

### **1. Le transfert de gène**

La thérapie génique consiste à introduire dans des cellules cibles du matériel génétique sous forme d'ADN ou d'ARN soit pour compenser une déficience génétique soit pour médier indirectement un effet thérapeutique. Si le transfert de gène a été utilisé dans un premier temps pour rétablir un ou plusieurs gènes altérés responsables de maladies génétiques, il peut également être employé comme « ADN-médicament ». En effet, les maladies pouvant être traitées par médicament protéique peuvent l'être également par le transfert de gène où l'ADN induira la synthèse de la protéine thérapeutique.

Le transfert de gènes apparaît aujourd'hui comme une stratégie prometteuse pour traiter non seulement des maladies monogéniques telles que la mucoviscidose mais aussi pour des maladies plus complexes ayant ou non des composantes génétiques telles que le diabète ou les maladies cardiovasculaires mais également pour des pathologies acquises comme le cancer et les maladies infectieuses.

Cependant, les acides nucléiques franchissent difficilement les membranes cellulaires hydrophobes de par les charges négatives apportées par les groupements phosphates des bases nucléiques (Farhood, H. *et al.*, 1992; Felgner PL *et al.*, 1987). D'où la nécessité d'utiliser différentes méthodes de vectorisation pour diminuer cette densité de charges négatives et faciliter ainsi le passage des acides nucléiques à travers les membranes cellulaires. Le transfert de gène repose donc essentiellement sur la mise au point de vecteurs efficaces pour le transport des acides nucléiques au sein des cellules cibles. Ces vecteurs peuvent être regroupés en deux catégories, les vecteurs viraux recombinants et les vecteurs synthétiques non viraux.

#### **1.1. Les vecteurs viraux**

L'utilisation des vecteurs viraux pour transporter un gène thérapeutique repose sur la capacité naturelle des virus à pénétrer dans les cellules hôtes pour y transférer leur génome. En effet, les virus naturels sont capables de reconnaître et de pénétrer dans les cellules hôtes puis d'utiliser la machinerie cellulaire pour se reproduire. Certains virus sont mêmes capables d'intégrer leur propre matériel génétique dans le génome des cellules infectées. Les virus doivent donc être modifiés génétiquement pour pouvoir les utiliser comme vecteurs viraux. En effet, ils ne doivent pas être

capables de se multiplier au sein des cellules qu'ils ont infectées et doivent contenir le gène d'intérêt afin de permettre l'expression de la protéine thérapeutique. Pour produire ces vecteurs viraux, une lignée cellulaire d'encapsulation exprimant les gènes de structure du virus est utilisée pour former des particules virales vides. Une construction génétique contenant la séquence d'ADN thérapeutique est ensuite introduite dans les cellules d'encapsulation permettant ainsi la production des virus recombinants qui sont constitués du gène thérapeutique intégré à leur génôme. Ces virus recombinants ne contiennent plus le matériel génétique viral nécessaire à la synthèse des protéines virales ainsi qu'à leur réplication mais ils sont toujours capables de transférer leur matériel génétique aux cellules cibles.

Aujourd'hui, les vecteurs viraux les plus utilisés pour le transfert de gène dérivent principalement des rétrovirus, des adénovirus et des virus AAVs (Adeno-Associated Virus) et ont déjà été utilisés en essais cliniques. Ils permettent un transfert de gène efficace *in vitro* et *in vivo* dans différents types cellulaires mais leur utilisation présente de nombreux inconvénients. Leur pathogénicité ainsi que les fortes réactions immunitaires et inflammatoires observées rendent leur utilisation difficile. De plus, la taille du transgène à transférer est limitée, leur production est difficile et coûteuse et des administrations répétées ne peuvent être envisagées à cause des réactions immunitaires dirigées contre le vecteur (Sakurai H *et al.*, 2008). C'est pourquoi, des vecteurs non viraux dits synthétiques ont été largement développés au cours de ces dernières années (Davis ME, 2002; Li S and Ma Z, 2001).

### **1.2. Les vecteurs non viraux**

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

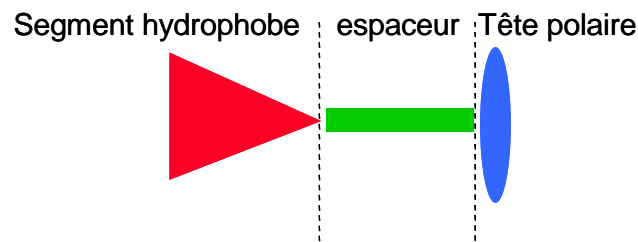
Les vecteurs synthétiques sont principalement des molécules cationiques de nature lipidique ou polymérique, capables d'interagir avec les charges négatives de l'ADN. Il en résulte des complexes vecteur/ADN chargés positivement au sein desquels l'ADN est compacté et qui présentent pour la plupart une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

commercialisés pour le transfert de gène *in vitro* sont constitués de ce type de molécules.

### 1.2.1. Les lipides cationiques

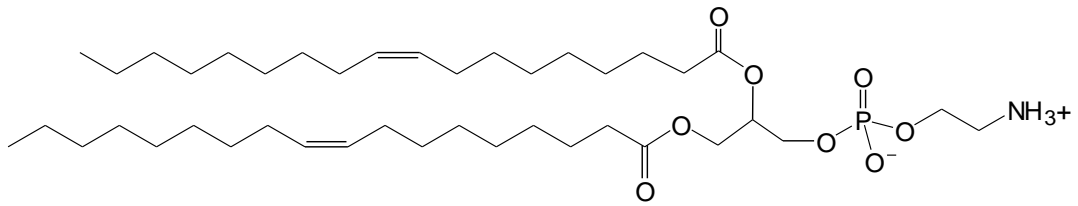
#### 1.2.1.1. Structure des lipides cationiques

Les lipides cationiques sont des molécules amphiphiles chargées positivement qui sont constitués de trois domaines fonctionnels : une tête polaire et une partie hydrophobe reliées par un bras espaceur (Figure 1). La tête polaire est la partie hydrophile du lipide qui porte les charges positives. Elle est composée le plus souvent de fonctions amines protonables pouvant interagir avec les phosphates de l'ADN pour former les complexes lipide cationique/ADN. Le bras espaceur influence la stabilité et la biodégradabilité du vecteur lipidique de par sa taille et sa nature. La partie hydrophobe est composée soit de chaînes aliphatiques, soit d'un groupement cholestérol.



**Figure 1: Structure schématique des lipides cationiques.** Les lipides cationiques sont constitués de 3 parties : la tête polaire qui porte les charges positives, le bras espaceur qui peut être utilisé pour introduire dans les lipides des fonctions biodégradables, et la partie hydrophobe constituée généralement de deux chaînes aliphatiques ou d'un groupement cholestérol.

Les lipides cationiques peuvent être classés en trois catégories, les monocationiques, les polycationiques et les dérivés du cholestérol (Zhang S *et al.*, 2004). Ils sont souvent associés à un co-lipide neutre, comme la DOPE (dioléoylphosphatidyléthanolamine) (Figure 2) pour permettre un transfert de gène efficace. En effet, la présence de la DOPE assure une meilleure efficacité de transfection de par ses propriétés fusogènes qui facilitent l'échappement endosomal par déstabilisation des membranes des endosomes (Hirsch-Lerner D *et al.*, 2005).

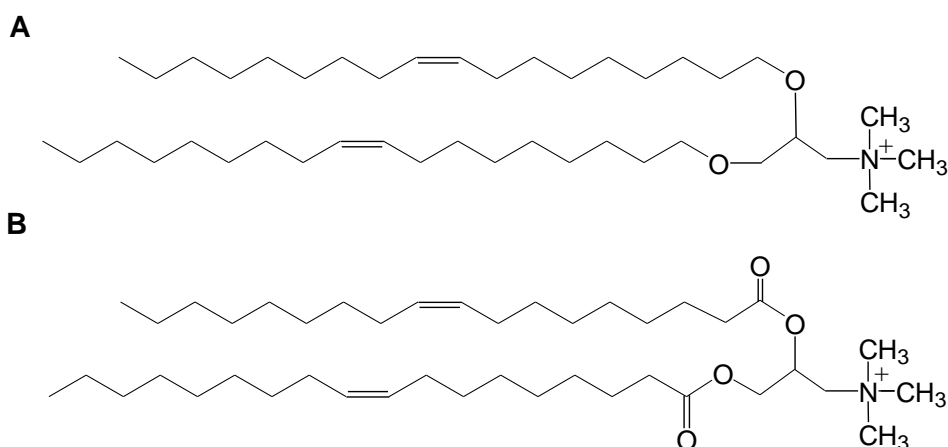


**Figure 2: Structure chimique de la DOPE**

### 1.2.1.1.1. Les lipides monocationiques

De nombreux lipides monocationiques ont été synthétisés en faisant varier la longueur de la chaîne d'acides gras ainsi que la taille et la nature du bras espaceur. Cependant, ils sont tous composés de deux chaînes d'acides gras reliées à une amine quaternaire simple par un bras espaceur. Parmi les plus connus, il y a le DOTMA (chlorure de N-[1-(2,3-dioléyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium) (Figure 3A) qui est le premier vecteur lipidique cationique synthétique à avoir été développé (Felgner PL *et al.*, 1987). Ce lipide cationique formulé à la DOPE est capable de transfecter efficacement de nombreux types cellulaires *in vitro* mettant ainsi en évidence la faisabilité du transfert de gène à l'aide de vecteurs lipidiques (Felgner PL and Ringold GM, 1989). Il est commercialisé sous le nom de Lipofectine<sup>®</sup>.

Le DOTAP (chlorure de 1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium-propane) est également un lipide cationique couramment utilisé pour le transfert de gène (McLachlan G *et al.*, 1995). C'est un analogue du DOTMA dont la structure ne varie que par la nature du bras espaceur (Figure 3B).



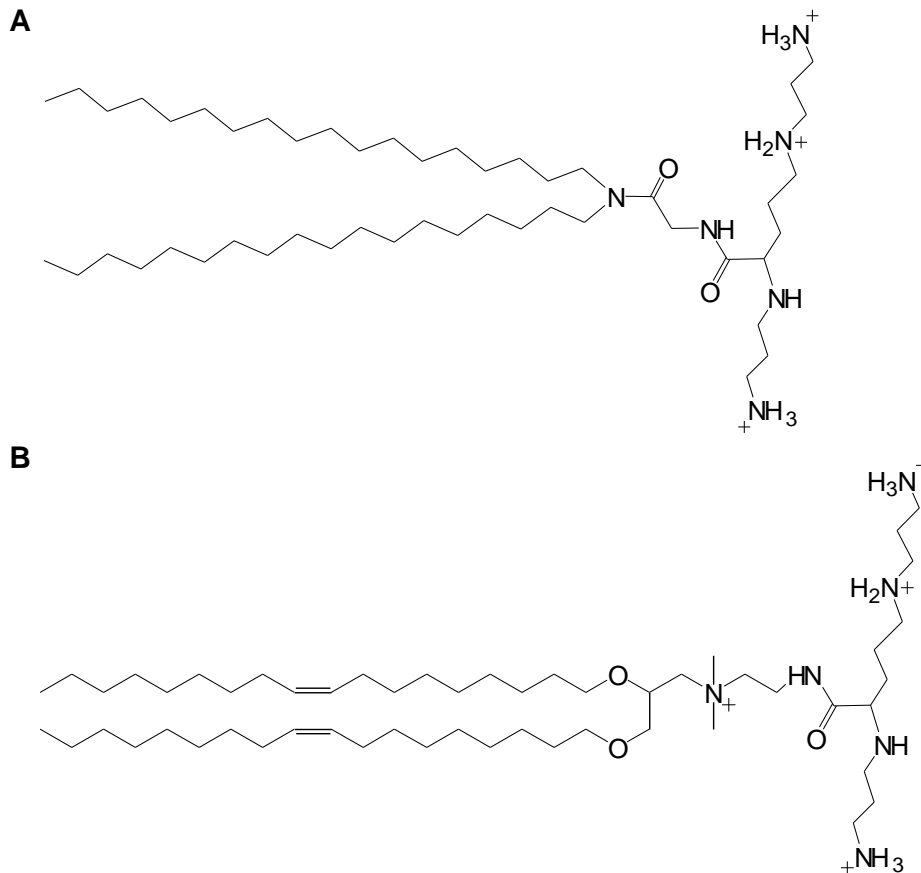
**Figure 3: Structure chimique du DOTMA (A) et du DOTAP (B).**



### **1.2.1.1.2. Les lipides polycationiques**

Les lipides polycationiques permettent un transfert de gène plus efficace que les lipides monocationiques. En effet, l'introduction au niveau de la tête polaire de composés polycationiques naturels a permis de générer des lipides peu toxiques ou biodégradables qui présentent une plus forte densité de charges positives que les lipides monocationiques facilitant ainsi la condensation de l'ADN (Behr JP *et al.*, 1989). C'est l'équipe française du Pr. J.P. Behr qui a mis au point le premier lipide polycationique, le DOGS (dioctadécylamine-glycine-spermine) commercialisé sous le nom de Transfectam<sup>®</sup> (Figure 4A). Il est constitué d'une polyamine de type spermine liée aux chaînes d'acides gras par une liaison peptidique métabolisable par la cellule qui permet d'améliorer la biodégradabilité de ce vecteur lipidique. De plus, les nombreuses amines protonées de la spermine permettent une meilleure compaction de l'ADN ce qui permet un transfert de gène efficace même en absence de DOPE (Behr JP *et al.*, 1989). Cependant, après complexation avec l'ADN, les lipoplexes DOGS/DOPE conduisent à une efficacité de transfection supérieure à celle des lipoplexes DOGS/ADN.

Le DOSPA (2,3-dioléyloxy-N-2-(spermine-carboxamido)éthyl-N,N-diméthyl-1-propanammonium) est un autre lipide polycationique connu (Figure 4B), qui est commercialisé sous le nom de Lipofectamine<sup>®</sup> lorsqu'il est mélangé à de la DOPE. La Lipofectamine<sup>®</sup> présente également une meilleure efficacité de transfection *in vitro* dans des cellules primaires ou en culture par rapport à celle obtenue avec les lipides monocationiques.



**Figure 4: Structure chimique du DOGS (A) et du DOSPA (B).**

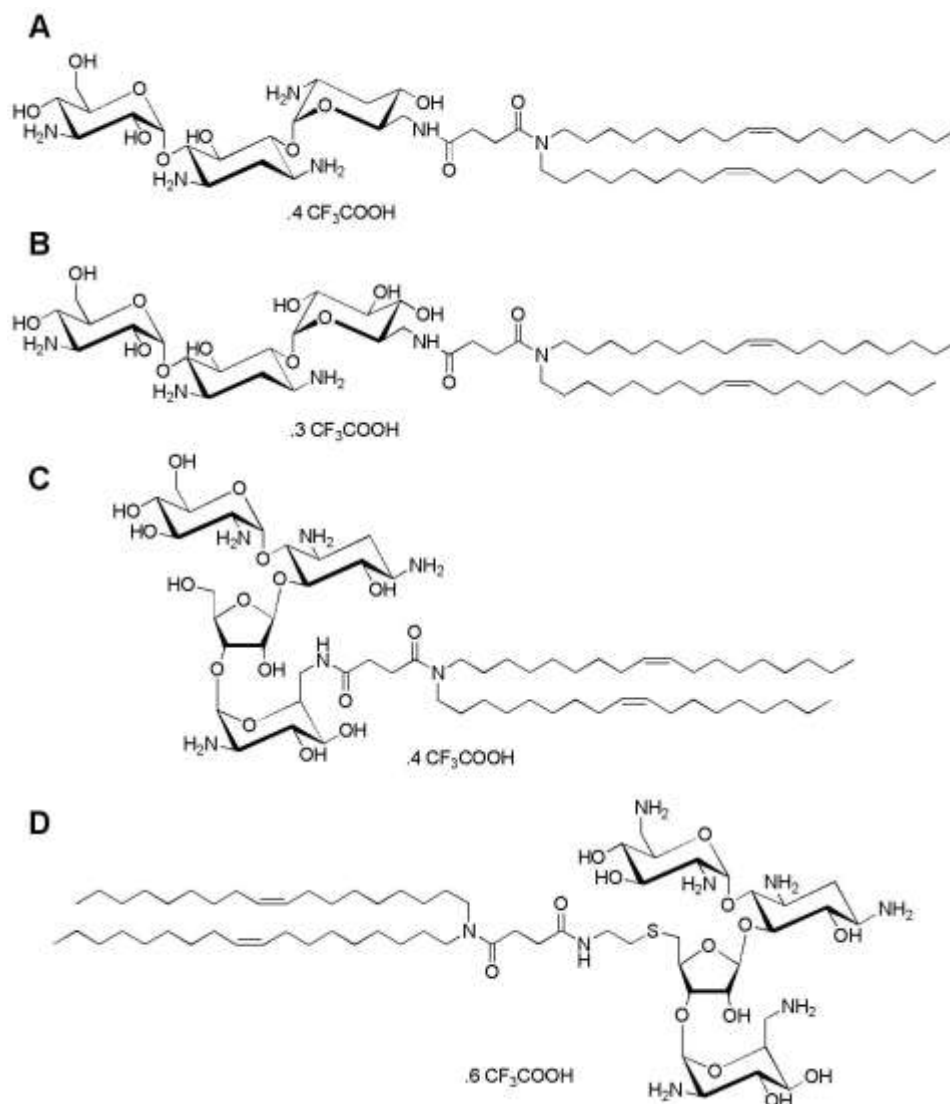
Les dérivés lipidiques d'aminoglycosides appartiennent également à la famille des lipides polycationiques et ont été décrits pour la première fois par l'équipe de Jean-Marie Lehn (Belmont P *et al.*, 2002). Ils ont pour particularité d'être constitués d'un aminoglycoside, groupement cationique jouant le rôle de la tête polaire, qui est reliée notamment à deux chaînes aliphatiques dioléyl via un groupement espaceur succinyl (Belmont P *et al.*, 2002; Sainlos M, 2004; Sainlos M *et al.*, 2005). Les aminoglycosides sont construits autour d'un noyau central commun formé par le groupement 2-déoxystreptamine substitué par différentes unités saccharidiques comportant les fonctions amine. Deux familles d'aminoglycosides peuvent être mises en évidence :

- les 4,6-disubstitués-2-déoxystreptamine tels que la tobramycine et la kanamycine.
- les 4,5-disubstitués-2-déoxystreptamine tels que la néomycine et la paromomycine.

L'utilisation de différents aminoglycosides comme groupement cationique a permis de générer de nombreux vecteurs synthétiques présentant une grande

variété de tête polaire constituée de composés naturels tels que la kanamycine, la tobramycine, la néomycine et la paromomycine (Desigaux L *et al.*, 2007).

Les dérivés lipidiques d'aminoglycosides ainsi obtenus correspondent à la DiOleylamine A-Succinyl-Tobramycine (DOST), DiOleylamine A-Succinyl-Kanamycine (DOSK), DiOleylamine A-Succinyl-Paromomycine (DOSP) et DiOleylamine A-Succinyl-Neomycine (DOSN) qui présentent respectivement 4, 3, 4 et 6 amines protonables par groupement aminoglycoside (Desigaux L *et al.*, 2007) (Figure 5). Les dérivés lipidiques d'aminoglycosides sont des vecteurs synthétiques efficaces pour le transfert de gène *in vitro* dans différentes cellules en culture et *in vivo* dans des poumons de souris (Belmont P *et al.*, 2002; Sainlos M *et al.*, 2005)

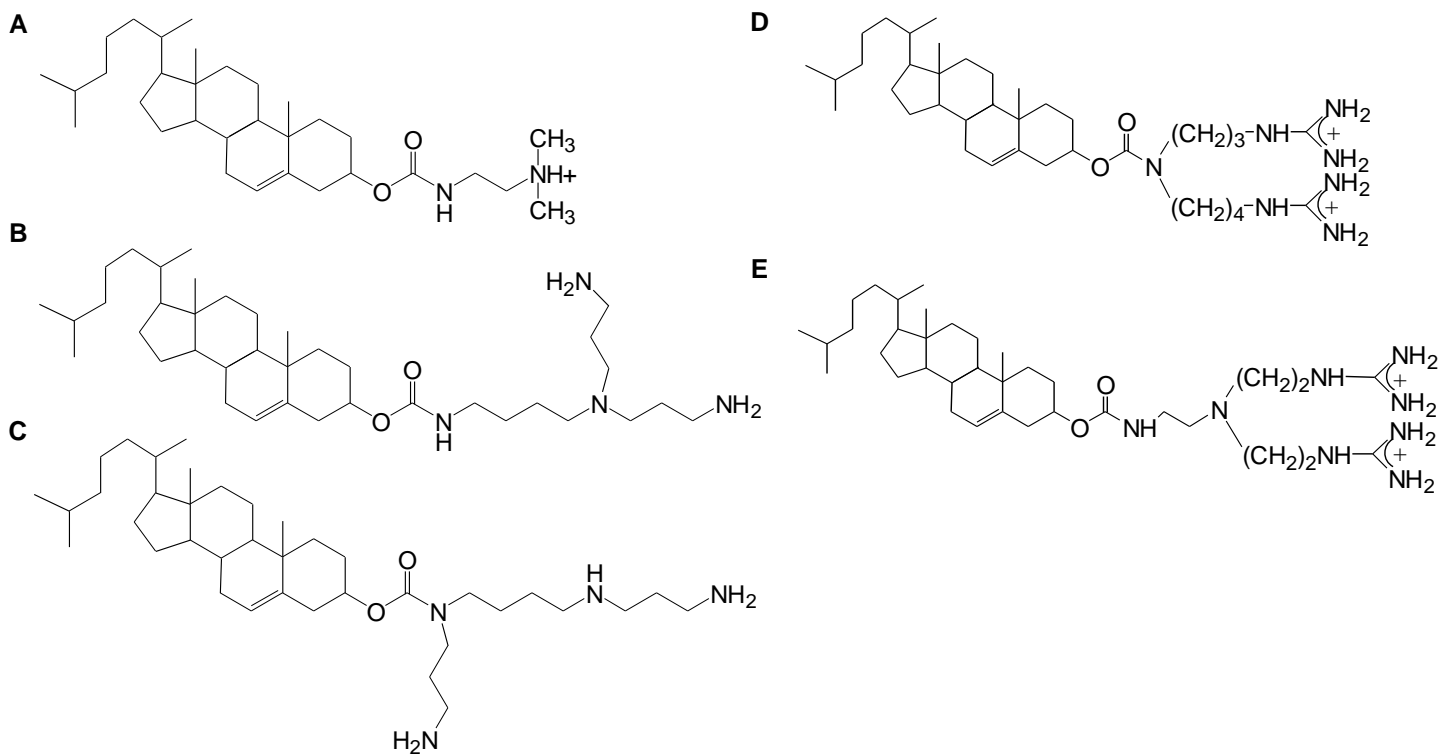


**Figure 5: Structure chimique des dérivés lipidiques d'aminoglycosides.** (A) DOST, (B) DOSK, (C) DOSP, (D) DOSN (d'après, Desigaux L *et al.*, 2007)

### **1.2.1.1.3. Les dérivés du cholestérol**

Plusieurs équipes ont développé des lipides dérivés du cholestérol mono ou polycationiques. Le cholestérol est utilisé pour former la partie hydrophobe du vecteur lipidique car il facilite la fusion des lipoplexes vecteur lipidique/ADN avec les membranes cellulaires permettant ainsi une meilleure internalisation des lipoplexes au sein des cellules cibles (Chen Z and Rand RP, 1997). Le premier dérivé cationique du cholestérol est un lipide monocationique, le DC-Chol (3[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle]cholesterol), utilisé en présence de DOPE pour former des liposomes qui conduisent à une forte efficacité de transfection dans de nombreux types cellulaires (Gao X and Huang L, 1991; Gao X and Huang L, 1995) (Figure 6).

Cependant, la plupart des dérivés du cholestérol développés aujourd'hui sont polycationiques. Ils sont caractérisés par une tête polaire de type spermine comme le cholestéryl-spermine, commercialisé sous le nom de Transfectall<sup>®</sup> (Moradpour D *et al.*, 1996) ou le GL67 (Lee ER *et al.*, 1996), qui présentent une efficacité de transfection supérieure à celle d'autres lipides cationiques (Figure 6). Ces dérivés lipidiques du cholestérol peuvent également être caractérisés par une tête polaire de type guanidinium. La fonction guanidine se trouve naturellement dans les arginines et joue un rôle important dans la liaison de l'ADN avec certaines protéines comme les histones et les protamines. Différents dérivés lipidiques contenant une fonction guanidine ont donc été synthétisés, le BGSC (bis(guanidinium)-spermine-cholesterol) et le BGTC (bis(guanidinium)-tren-cholesterol) (Pitard B *et al.*, 1999; Vigneron JP *et al.*, 1996) en sont deux exemples (Figure 6).



**Figure 6: Structure chimique des dérivés du cholestérol.** (A) DC-Chol, (B) cholestéryl-spermine, (C) GL67, (D) BGSC et (E) BGTC.

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

Afin d'améliorer l'efficacité de ces vecteurs *in vivo*, les recherches se sont concentrées sur l'étude de la relation entre la structure du lipide et celle des lipoplexes, en fonction de son efficacité de transfection. Plusieurs méthodes ont ainsi été développées pour caractériser les propriétés physico-chimiques des lipoplexes.

### **1.2.1.2. Caractérisation des complexes lipide cationique/ADN**

Les complexes lipide cationique/ADN sont formés à partir de lipides préparés sous forme de liposomes ou de micelles qui sont ensuite formulés à une solution d'ADN plasmidique (Pitard B *et al.*, 2002a). Les liposomes sont obtenus soit par réhydratation du film lipidique, (Szoka F and Papahadjopoulos D, 1978) soit par extrusion (<http://www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes.html>). Ils présentent généralement une structure unilamellaire d'environ 100 à 200 nm de diamètre, et sont généralement préparés avec un lipide neutre tel que la DOPE. La formation des lipoplexes repose donc sur un mécanisme d'auto-assemblage faisant principalement intervenir des interactions électrostatiques entre l'ADN plasmidique et le lipide cationique. Il est donc important de définir pour chaque lipoplexe le rapport de charge lipide cationique/ADN (+/-), correspondant au nombre de moles de charges positives apportées par le lipide cationique par rapport au nombre de moles de charges négatives apportées par les groupements phosphates de l'ADN, qui détermine la taille et la charge des complexes ainsi que le degré de complexation de l'ADN et donc l'efficacité de transfection.

Pour cela, différentes techniques ont été développées pour caractériser la structure supramoléculaire des lipoplexes et comprendre ainsi les mécanismes impliqués dans leur formation (Bartreau B *et al.*, 2008) :

- La mesure de la taille des lipoplexes est généralement étudiée par diffusion quasi-élastique de la lumière et par microscopie électronique.
- La complexation de l'ADN est évaluée par des expériences d'électrophorèse sur gel d'agarose et par mesure de l'extinction de la fluorescence du bromure d'éthidium (BET) en solution.
- La charge de surface des lipoplexes est définie par la mesure du potentiel zéta.
- La morphologie des lipoplexes peut être observée par microscopie électronique ou par la technique des rayons X à petits angles (SAXS).

#### **1.2.1.2.1. Mesure de taille des complexes lipide cationique/ADN**

Pitard *et al.* ont montré que la taille et la charge de surface des complexes lipide cationique/ADN dépendaient du rapport de charge (+/-) qui conduit à la formation de complexes présentant des caractéristiques physico-chimiques ainsi qu'une stabilité colloïdale différentes (Bartreau B *et al.*, 2008; Pitard B *et al.*, 2002a). L'étude de la

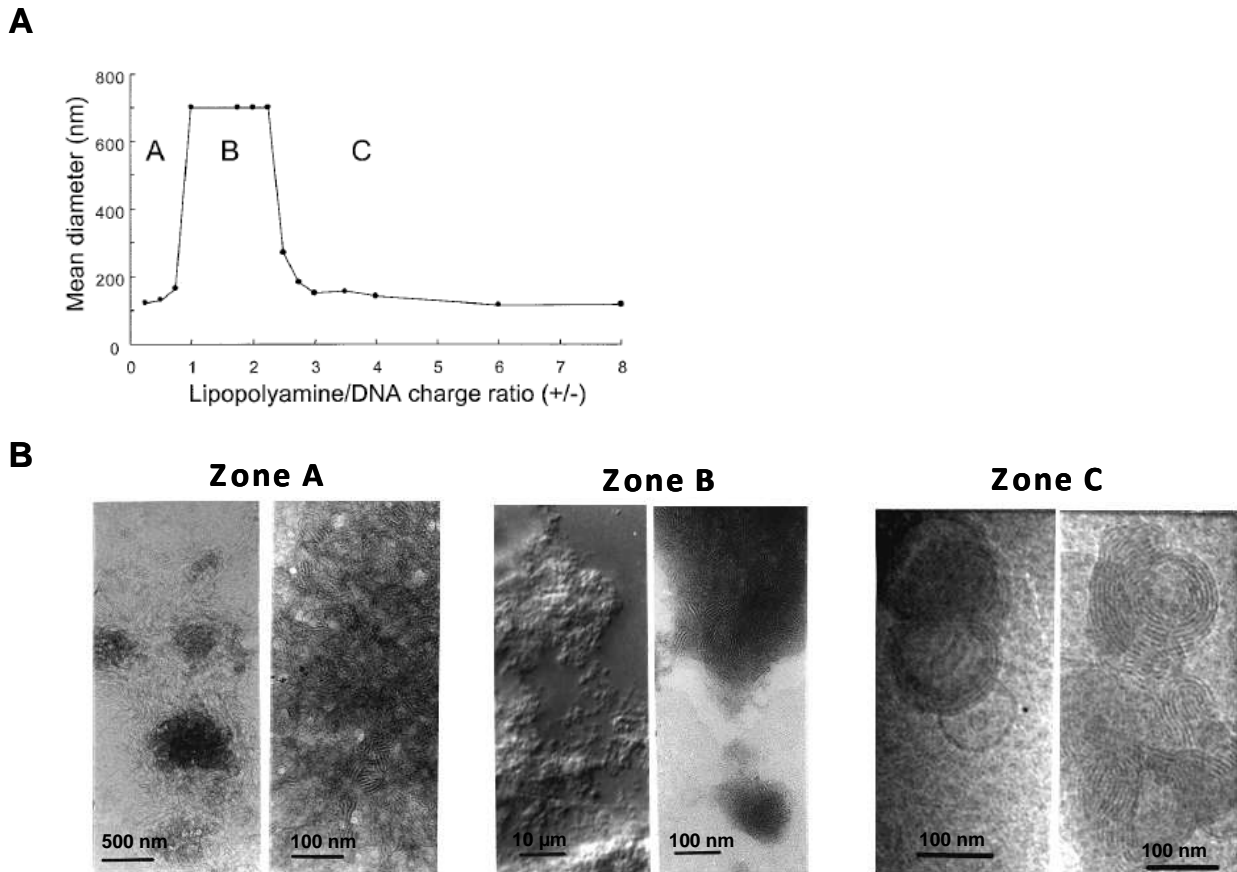
stabilité des lipoplexes, désignée par le terme de stabilité colloïdale, en fonction du rapport de charge (+/-) est essentielle pour déterminer les conditions optimales de formulation conduisant à la meilleure efficacité de transfection.

Les complexes lipide cationique/ADN sont caractérisés par trois zones de stabilité colloïdale en fonction du rapport de charge (+/-). Ces trois zones A, B et C sont observées quelque soit le lipide utilisé (Bartreau B *et al.*, 2008) et l'organisation supramoléculaire initiale, c'est-à-dire sous forme de liposomes ou de micelles (Pitard B *et al.*, 1999).

Par exemple, le diagramme de stabilité colloïdale des lipoplexes lipopolyamine-ADN présente trois zones distinctes en fonction du rapport de charge (+/-) (Bartreau B *et al.*, 2008). Les objets constituant ces trois zones ont été caractérisés par cryo-microscopie à transmission électronique (cryo-TEM) ainsi que par mesures du potentiel zéta pour déterminer les charges globales de surface des lipoplexes.

Les lipoplexes formés à des rapports de charges inférieurs à 1 correspondent à la zone A (Figure 7A et 7B). Ce sont des particules stables colloïdalement chargées négativement d'environ 200 nm de diamètre. La zone B est caractérisée par un rapport de charge proche de l'électroneutralité, compris entre 1 et 2 (Figure 7A). Les particules formées dans la zone B possèdent une charge globale neutre mais en absence de répulsion électrostatique, les lipoplexes sont instables colloïdalement et forment de larges agrégats qui ne peuvent pas être mesurés par diffusion quasi-élastique de la lumière (Figure 7B). Enfin la zone C (pour des rapports de charge supérieurs à 2) est constituée de lipoplexes chargés positivement, stables colloïdalement et présentant un diamètre d'environ 100 nm (Figure 7A et 7B). Ces lipoplexes chargés positivement sont capables de conduire à une transfection efficace de cellules *in vitro* de par leur internalisation via les interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires chargées négativement (Pitard B *et al.*, 1997).

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



**Figure 7: Stabilité colloïdale des lipoplexes lipopolyamine-ADN.** (A) La taille des lipoplexes lipopolyamine-ADN a été mesurée par diffusion quasi-élastique de la lumière en fonction du rapport de charge lipide cationique/ADN (+/-). (B) Visualisation des lipoplexes issus des trois zones de stabilité colloïdale A, B et C par cryo-TEM (Modifié d'après Barteau B et al., 2008; Pitard B et al., 1997; Pitard B et al., 2002a).

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

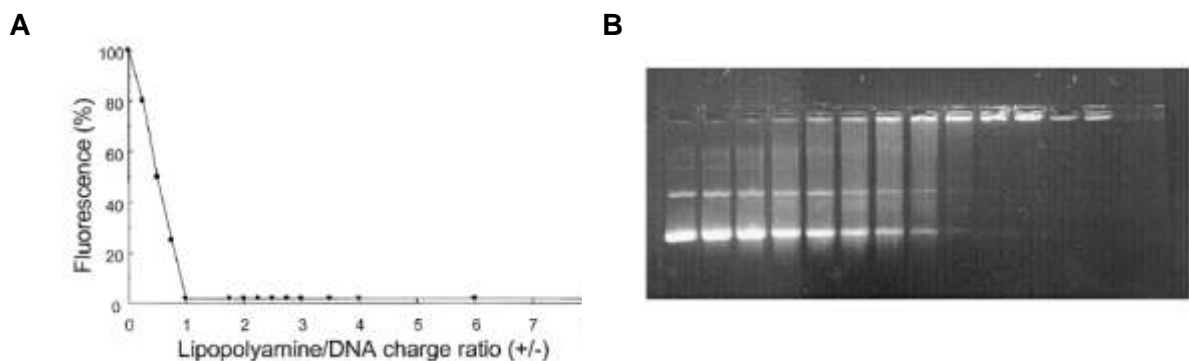
Pour vérifier la complexation des molécules d'ADN au sein des lipoplexes des mesures de fluorescence sont généralement réalisées après introduction d'une solution de BET à celle des lipoplexes. Le BET est une sonde fluorescente qui s'intercale entre les paires de bases de l'ADN lorsque ce dernier n'est pas complexé aux lipides cationiques. La fluorescence est exprimée en pourcentage à partir du niveau de fluorescence d'une solution d'ADN plasmidique non complexé aux lipides cationiques obtenue en présence de BET.

Les lipoplexes lipopolyamine-ADN présentés précédemment ont également été caractérisés par mesures de fluorescence en fonction du rapport de charge (+/-)



(Bartreau B *et al.*, 2008). La Figure 8A montre que l'intensité de la fluorescence du BET diminue lorsque le rapport de charge (+/-) augmente. Ceci indique que l'ADN est accessible au BET pour des rapports de charges inférieurs à 1, ce qui correspond aux objets de la zone A chargés négativement où l'ADN est partiellement condensé. En revanche, pour des rapports de charge plus élevés (supérieurs à 1), l'intensité de la fluorescence du BET en solution tend vers des valeurs très faibles. Par conséquent, la totalité des molécules d'ADN sont complexées au sein des lipoplexes de la zone B et C, contrairement aux objets de la zone A où une partie de l'ADN reste accessible au BET.

La complexation des molécules d'ADN au sein des complexes lipide cationique/ADN peut également être mesurée par électrophorèse sur gel d'agarose. Une solution d'ADN a la capacité de migrer à travers un gel d'agarose chargé en BET lorsqu'il est placé sous un champ électrique. Dans le cas des lipoplexes lipopolyamine-ADN, l'ADN formulé en présence de lipide cationique à un rapport de charge (+/-) croissant migre de moins en moins dans le gel d'agarose. En effet, à partir du rapport de charge de 1, aucune molécule d'ADN ne migre dans le gel (Figure 8B), ce qui corrobore les mesures de fluorescence du BET en solution (Figure 8A).



**Figure 8 : Complexation de l'ADN au sein des lipoplexes.** (A) Mesure de la fluorescence résiduelle du BET en fonction du rapport de charge (+/-). (B) Gel d'agarose des lipoplexes lipopolyamine-ADN en fonction du rapport de charge (+/-) compris entre 0 et 8 (d'après Bartreau B *et al.*, 2008).

Ainsi, seuls les objets de la zone B et de la zone C présentent la capacité de complexer les molécules d'ADN au sein de leur assemblage supramoléculaire et donc de les protéger de la dégradation par les nucléases. Ces conclusions ont

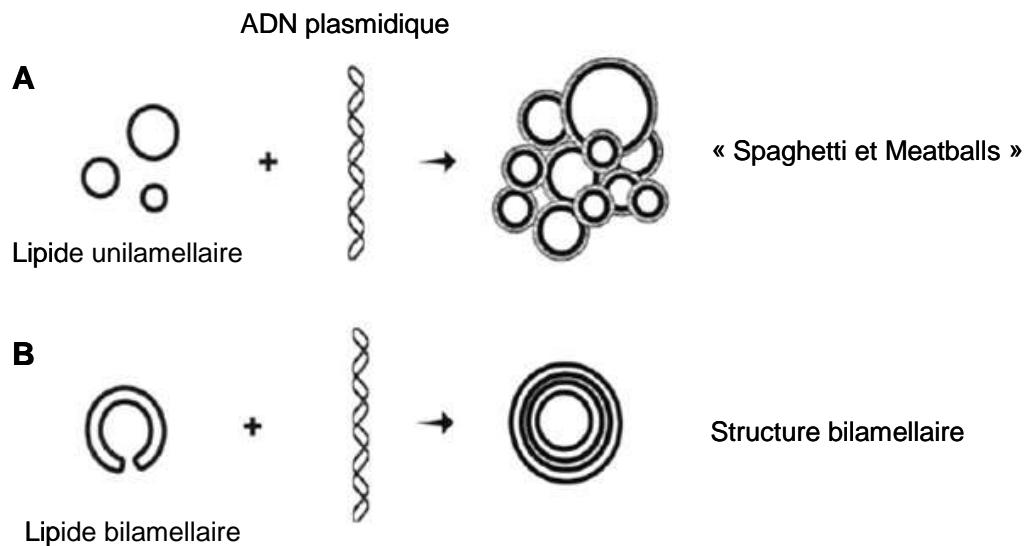
également été mises en évidence pour de nombreux lipides cationiques quelque soit leur structure supramoléculaire initiale (Bartreau B *et al.*, 2008; Pitard B *et al.*, 2002a).

### **1.2.1.2.3. Structure des complexes lipide cationique/ADN**

La diffraction des rayons-X à petits angles (SAXS) est la technique la plus utilisée pour déterminer l'organisation supramoléculaire des complexes lipide cationique/ADN. Gherson *et al.* ont montré que la structure de départ des lipides cationiques est profondément modifiée en présence de l'ADN plasmidique. Il semble y avoir un réarrangement des structures de départ reposant sur la fusion des lipides cationiques et la condensation de l'ADN plasmidique (Gershon H *et al.*, 1993). En effet, plusieurs groupes de recherche ont montré que des phases hautement ordonnées sont formées quand l'ADN est complexé en présence de lipides cationiques (Bartreau B *et al.*, 2008). Différents assemblages supramoléculaires ont été décrits en fonction de la nature et de l'organisation structurale des lipides cationiques de départ (Templeton NS, 2002). Ces structures diffèrent de l'hypothèse initiale qui suggérait que les lipides cationiques non modifiés recouvraient progressivement l'ADN selon un schéma de type « collier de perles » (Felgner PL and Ringold GM, 1989).

- Des structures tubulaires de type « Spaghetti » ainsi que des structures sphériques de type « Meatballs » ont été obtenues à partir de lipides unilamellaires condensant l'ADN sur une surface (Sternberg B *et al.*, 1994) (Figure 9A).

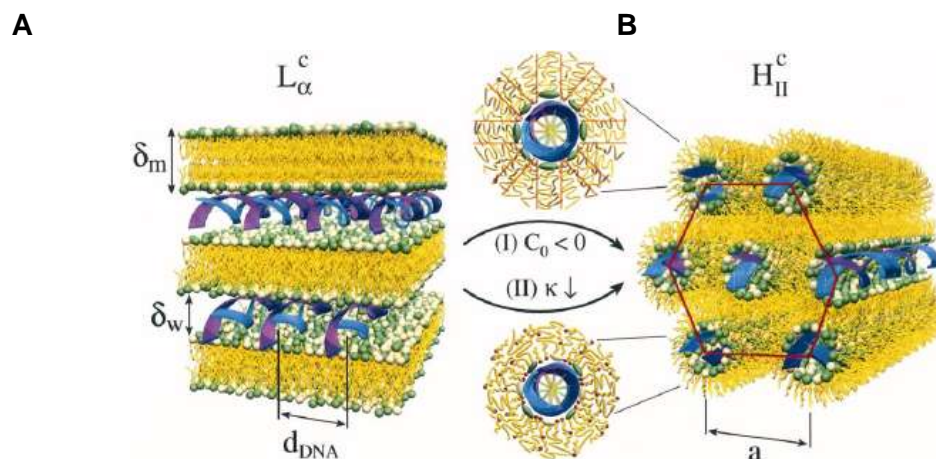
- Des structures bilamellaires où l'ADN plasmidique est intercalé entre deux couches lipidiques sont formées après complexation de l'ADN avec des lipides bilamellaires (Templeton NS *et al.*, 1997) (Figure 9B).



**Figure 9: Représentation schématique des structures tubulaires (A) et bilamellaires (B) des complexes lipide cationique/ADN. (d'après Templeton NS, 2002).**

- Une organisation multilamellaire (Figure 10A) présentant une alternance feuillet lipidique/monocouche d'ADN a également été identifiée pour les lipoplexes DOTAP-ADN (Rädler JO *et al.*, 1997). Ce même type de structure lamellaire a été observé pour les lipoplexes BGTC-ADN mais aussi pour les lipoplexes lipopolyamines/ADN (Pitard B *et al.*, 1997; Pitard B *et al.*, 1999).

- Une nouvelle structure de type hexagonale inversée (HE) a été mise en évidence pour les lipoplexes DOTAP/DOPE-ADN (Figure 10B) (Koltover I *et al.*, 1998).



**Figure 10: Représentation schématique de la phase multilamellaire (A) et de la phase hexagonale inversée (B) proposée pour les lipoplexes DOTAP/DOPE-ADN. L'ADN (en bleu) s'organise avec les lipides (en jaune) en une structure de type lamellaire (L) ou hexagonale inverse (H) (d'après Koltover I *et al.*, 1998).**

La phase HE observée pour la formulation des lipoplexes DOTAP/DOPE-ADN serait due à la présence du co-lipide neutre, la DOPE. Cependant, il est difficile d'établir des règles générales quant à l'effet de la DOPE sur l'assemblage supramoléculaire des lipoplexes et de la formation de la phase HE. En effet, dans la majorité des études réalisées, ce sont des structures multilamellaires qui ont été le plus souvent caractérisées (Tableau 1).

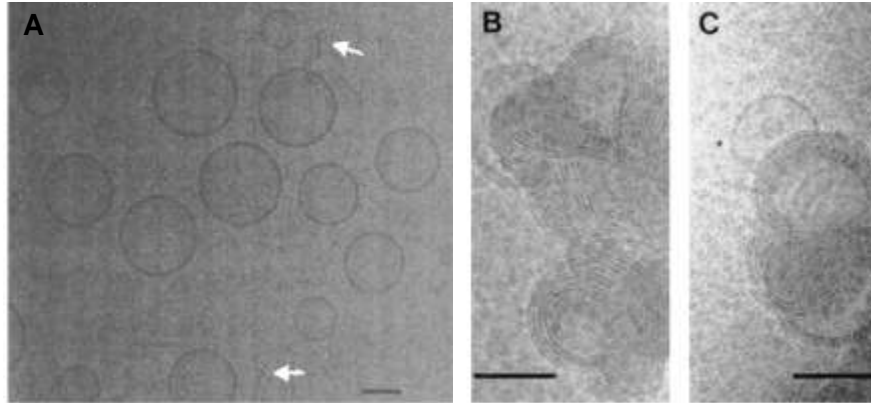
Lipide cationique (ratio molaire)	Structure observée par SAXS	Références
DOTAP/DOPE	Multilamellaire	(Rädler JO <i>et al.</i> , 1997)
DOTAP/DOPE	Multilamellaire ou hexagonale inversée ; la structure obtenue dépend du ratio molaire DOTAP/DOPE	(Koltover I <i>et al.</i> , 1998)
BGTC/DOPE (3/2)	Multilamellaire	(Pitard B <i>et al.</i> , 1999)
DOGS	Multilamellaire	(Boukhnikachvili T <i>et al.</i> , 1997)
DOGS/DOPE/Cardiolipin (0.35/0.52/0.13) (Micelles cationiques)	Multilamellaire	(Schmutz M <i>et al.</i> , 1999)
Micelles sphériques de lipopolyamine	Multilamellaire	(Pitard B <i>et al.</i> , 1997)
Micelles de BGTC	Multilamellaire	(Pitard B <i>et al.</i> , 1999)

**Tableau 1: Tableau récapitulatif des structures obtenues après formulation de l'ADN à différents lipides cationiques.** (d'après Barteau B *et al.*, 2008).

#### 1.2.1.2.4. Morphologie des complexes lipide cationique/ADN

Différentes techniques de microscopie électronique ont été utilisées pour étudier la morphologie des complexes lipide cationique/ADN. La microscopie électronique par cryofracture ne permet pas de voir l'ADN seul. Cependant, cette technique a quand même mise en évidence la formation des structures de type « Spaghetti » dans lesquelles l'ADN est condensé (Sternberg B *et al.*, 1994). La microscopie électronique à transmission (TEM) permet également de montrer la morphologie de certains lipoplexes comme celle des lipoplexes DOGS-ADN qui forment une matrice de micelles tubulaires où l'ADN plasmidique est intercalé et condensé (Labat-Moleur F *et al.*, 1996). Enfin, la cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM) qui est utilisée par plusieurs groupes (Pitard B *et al.*, 1997; Pitard B *et al.*, 1999;

Templeton NS *et al.*, 1997), a permis de caractériser les structures bilamellaires observées par Templeton *et al.* mais également les structures concentriques multilamellaires obtenues pour les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN (Figure 11) (Pitard B *et al.*, 1999).



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

#### 1.2.1.2.5. Efficacité de transfection des lipides cationiques *in vitro*

Une comparaison de l'efficacité de transfection de tous les lipides cationiques serait assez difficile à réaliser en raison du grand nombre de lipides cationiques synthétisés. De plus, l'efficacité de transfection d'un lipide dépend de la lignée cellulaire utilisée (Liu D *et al.*, 2003). Cependant, les données de la littérature permettent de définir l'effet de la structure des complexes lipide cationique/ADN sur l'efficacité de transfection. En effet, il a été largement montré que le rapport de charges +/- influençait la taille, la stabilité colloïdale, le potentiel zéta et donc les interactions des complexes lipide cationique/ADN avec les membranes cellulaires ainsi que leur internalisation (Pitard B *et al.*, 2002a). Les complexes lipide cationique/ADN qui présentent les meilleures efficacités de transfection sont les lipoplexes appartenant à la zone C. En effet, les lipoplexes issus de cette zone correspondent à des complexes assurant une condensation complète des molécules d'ADN. Les objets de la zone B, bien qu'instables colloïdalement, conduisent également à une bonne efficacité de transfection qui reste néanmoins inférieure à celle obtenue avec les lipoplexes de la zone C. D'ailleurs, dans la plupart des protocoles de transfection *in vitro* disponibles dans le commerce, les fournisseurs recommandent généralement d'utiliser un excès de lipide cationique par rapport à

l'ADN. Une optimisation de la quantité d'ADN et du rapport de charge lipide cationique/ADN est également suggéré pour chaque lignée cellulaire.

### **1.2.2. Les polymères cationiques**

Les polymères cationiques peuvent également être utilisés comme vecteurs synthétiques pour le transfert de gène et représentent ainsi une alternative aux lipides cationiques. Les polymères cationiques s'auto-assemblent avec l'ADN par le même mécanisme que les lipides cationiques, c'est-à-dire par interactions de charges, pour conduire à la formation de complexes polymère cationique/ADN appelés polyplexes (Felgner PL *et al.*, 1997). Quatre types de polymères cationiques sont généralement utilisés pour le transfert de gène, les dérivés de polyéthylèneimine et de polylysine ainsi que les dendrimères et les chitosans.

#### **1.2.2.1. Structure des polymères cationiques**

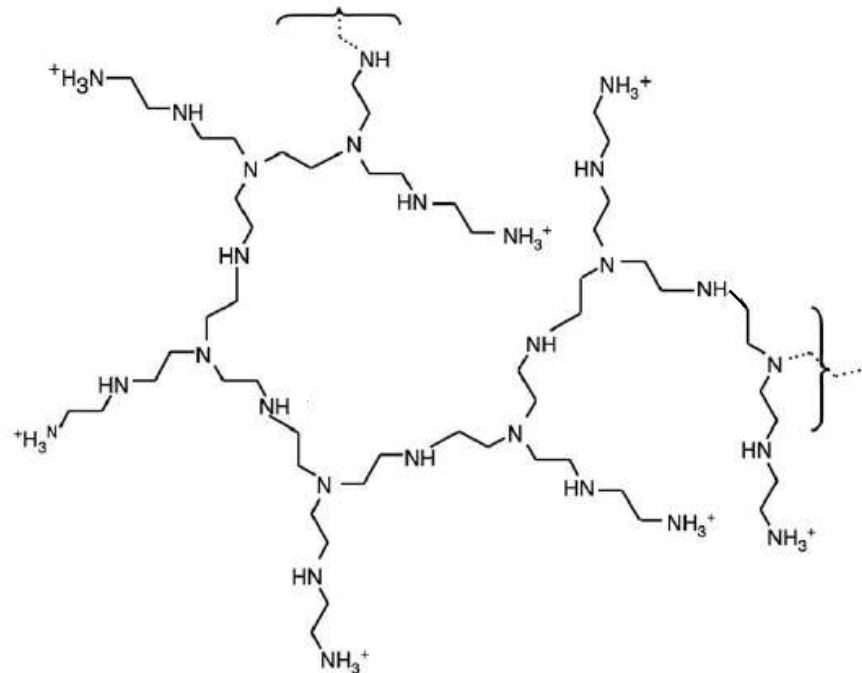
##### **1.2.2.1.1. Le polyéthylène-imine (PEI)**

Le PEI est un polymère cationique possédant une activité intrinsèque endosomolytique, qui est utilisé depuis longtemps pour le transfert d'ADN (Boussif O *et al.*, 1995; Demeneix B and Behr JP, 2005; Kircheis R *et al.*, 2001c). Le PEI est un polymère formé par la répétition d'une unité éthylène-imine présentant une fonction amine tous les trois atomes. Ainsi la présence de fonctions amines protonables à pH physiologique, lui confère une importante densité de charges cationiques qui assure la complexation de l'ADN par interactions électrostatiques. De plus, cette forte densité de charges participe à l'échappement endosomal des polyplexes lors du trafic intracellulaire en faisant du PEI une véritable « éponge à protons » (Boussif O *et al.*, 1995). Cette particularité contribue à l'efficacité de transfection du PEI à la fois pour le transfert de gène *in vitro* et *in vivo*.

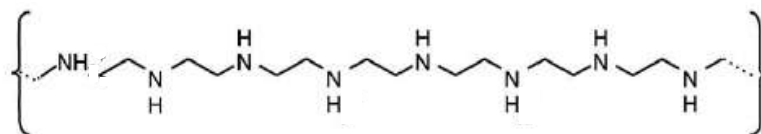
Cependant, l'efficacité de transfection de ce vecteur synthétique varie suivant la forme et le poids moléculaire du PEI utilisé (Demeneix B *et al.*, 1998; Kircheis R *et al.*, 2001c). En effet, la synthèse chimique du PEI peut conduire suivant le mode de polymérisation à un PEI linéaire ou ramifié qui présentent différents poids moléculaires oscillant entre 800 Da et 800 kDa pour les PEIs ramifiés et entre 22 kDa et 220 kDa pour les PEIs linéaires (Figure 12A et 12B). Différentes études de comparaison ont montré *in vitro* que l'efficacité des PEI linéaires était comparable à celle des PEI branchés pour un même poids moléculaire. En revanche *in vivo*, ce

sont les PEI linéaires qui conduisent à une meilleure efficacité de transfection (Wightman L *et al.*, 2001). En effet, il a été montré que les complexes PEI linéaire/ADN avaient moins tendance à s'agréger au niveau des érythrocytes (Kichler A *et al.*, 2001) limitant ainsi les risques de microembolies après une injection systémique (Abdallah B *et al.*, 1996) mais le PEI induit néanmoins une importante toxicité.

A



B

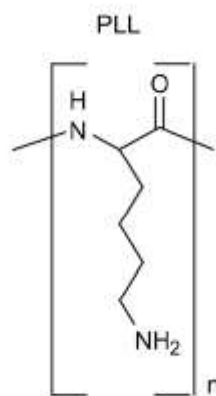


**Figure 12: Structure chimique du PEI branché (A) et linéaire (B).**

#### 1.2.2.1.2. La polylysine (PLL)

La PLL est un des polymères cationiques les plus utilisés pour le transfert d'ADN (Wolfert MA *et al.*, 1999). En effet de par sa structure peptidique (Figure 13), la PLL possède une nature biodégradable qui est un avantage non négligeable pour une utilisation *in vivo*. Les polyplexes PLL/ADN sont internalisés dans les cellules de façon comparable à celle des polyplexes PEI/ADN mais leur efficacité de transfection est plus faible. Cette faible activité serait due au nombre insuffisant de groupements

amines constituant la PLL qui présenterait alors une activité endosomolytique trop faible pour assurer l'échappement endosomal des polyplexes PLL/ADN qui seraient donc dégradés par les lysosomes (Merdan T *et al.*, 2002; Morille M *et al.*, 2008). Afin d'améliorer l'efficacité de transfection de la PLL, les polyplexes PLL/ADN sont généralement transfectés en présence d'un agent endosomolytique comme la chloroquine dans le milieu de culture (Pouton CW *et al.*, 1998; Wagner E *et al.*, 1992). Cependant, la PLL provoque une toxicité plus ou moins élevée malgré ses propriétés biodégradables (Choi, Y.H. *et al.*, 1998; Farhood, H. *et al.*, 1992).

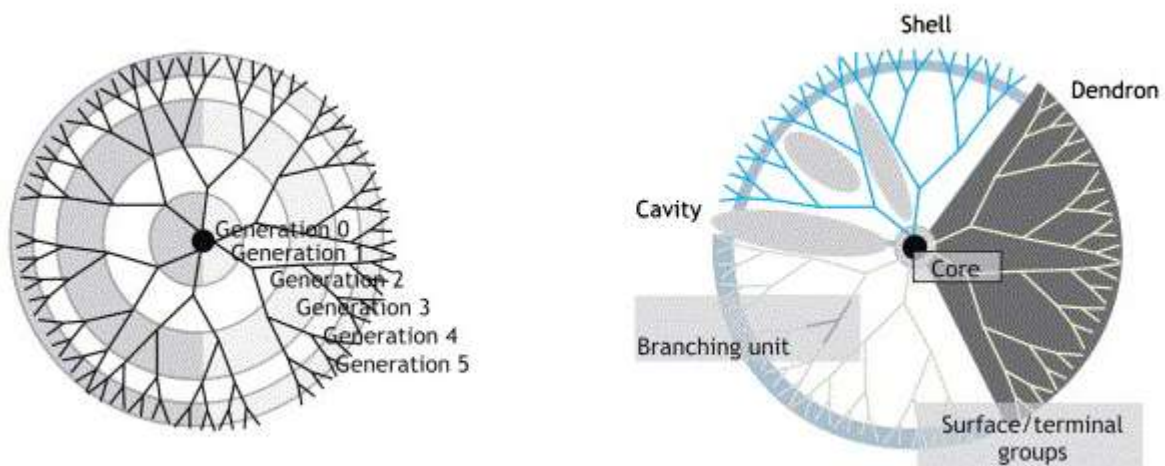


**Figure 13: Structure chimique de la PLL.**

### 1.2.2.1.3. Les dendrimères

Les dendrimères (du grec « dendron » : arbre) sont des polymères sphériques branchés qui ont la spécificité d'avoir une structure tridimensionnelle hiérarchique (Dykes GM *et al.*, 2001). Le cœur de la molécule joue le rôle de point central à partir duquel les monomères se ramifient de façon ordonnée et symétrique (Figure 14). La plupart des dendrimères utilisés sont des polyamines, des polyamides ou des polyesters, mais le plus fréquemment utilisé est le polyamidoamine (PAMAM) qui a été développé en 1993 par l'équipe de Szoka pour être utilisé comme vecteur synthétique cationique pour le transfert de gène (Haensler J and Szoka FC Jr, 1993).





**Figure 14: Schéma de la structure générale des dendrimères.** (d'après Dufès C et al., 2005).

Cette architecture moléculaire confère aux dendrimères des propriétés différentes par rapport à tous les autres polymères employés pour le transfert d'ADN. Leur méthode de synthèse permet de contrôler la formation des dendrimères puisque qu'elle est réalisée génération par génération. Chaque point de ramification correspond à une génération (Figure 14). En général, les dendrimères synthétisés sont cationiques avec une taille et une structure bien caractérisées ainsi qu'avec une faible polydispersité.

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

dégradés ce qui leur permet de former des polyplexes plus stables (Morille M *et al.*, 2008).

#### 1.2.2.1.4. Les chitosans

Les chitosans sont des polysaccharides cationiques linéaires et biodégradables composés d'unités N-acétyl-glucosamine et D-glucosamine liées par des liaisons  $\beta(1 \rightarrow 4)$  (Figure 15). Les chitosans sont obtenus par la déacétylation de la chitine qui est un composé de l'exosquelette des crustacés et des insectes (Hejazi R and Amiji M, 2003; Romøren K *et al.*, 2002). Les chitosans étant des polysaccharides cationiques, ils sont capables d'interagir avec l'ADN par interactions électrostatiques et former ainsi des petites particules stables qui dépendent du poids moléculaire ainsi que du degré de déacétylation des polysaccharides (Illum L *et al.*, 2001). Ce polymère cationique offre également une protection contre la dégradation par les DNases qui est comparable à celle du PEI (Köping-Höggård M *et al.*, 2001). Les chitosans permettent un transfert de gène efficace *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs types cellulaires. Cependant, leur efficacité reste plus faible que celle générée par les lipides cationiques ou par d'autres polymères cationiques (Li S and Ma Z, 2001).

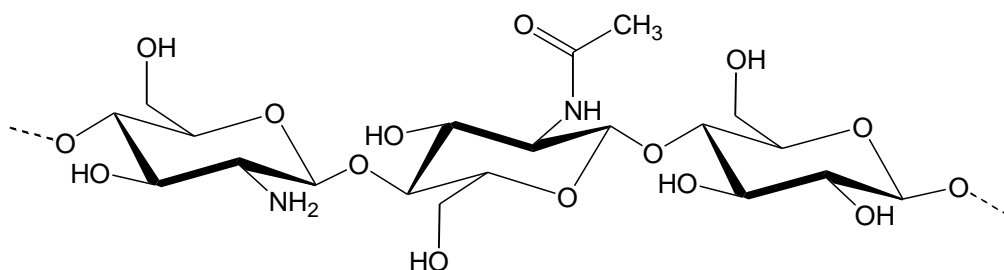


Figure 15: Structure chimique des chitosans.

#### 1.2.2.2. Caractérisation des polyplexes

Les complexes polymère cationique/ADN conduisent généralement à une bonne efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo* bien qu'ils induisent une forte toxicité. Cependant, l'efficacité de transfection de ces polymères varie suivant le poids moléculaire, le degré de polymérisation, la densité de charge et le type de polymère cationique utilisé. Par conséquent, pour comprendre ces variations et améliorer ainsi l'efficacité de ces vecteurs, les complexes polymère cationique/ADN ont été

caractérisés par diverses techniques physico-chimiques afin de déterminer la relation entre la structure du polymère et l'efficacité de transfection des polyplexes.

Les techniques physico-chimiques et microscopiques utilisées pour caractériser les polyplexes sont les mêmes que celles qui ont été employées pour les lipoplexes :

- Diffusion quasi-élastique de la lumière pour mesurer la taille des polyplexes.

- Mesures de fluorescence du BET en solution et électrophorèses sur gels d'agarose pour évaluer la complexation des molécules d'ADN au sein des polyplexes.

- Mesures du potentiel zéta pour définir la charge de surface des particules.

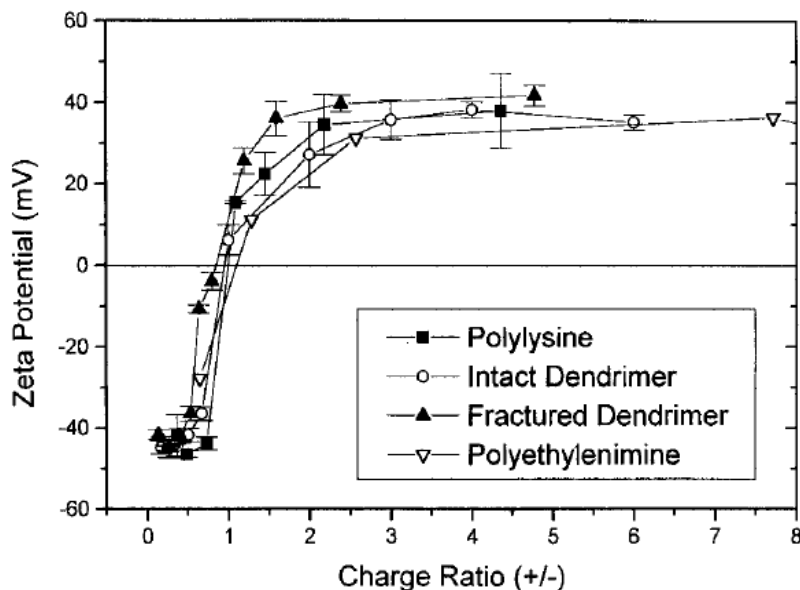
En revanche pour la morphologie des polyplexes, deux nouvelles techniques ont fait leur apparition. En plus de la microscopie électronique, les polyplexes ont été caractérisés par microscopie à forces atomiques (AFM) ainsi que par microscopie à effet de force (SFM, Scanning Force Microscopy).

#### **1.2.2.2.1. Stabilité colloïdale, potentiel zéta et complexation de l'ADN**

La formation des polyplexes repose principalement sur les interactions électrostatiques entre les charges positives apportées les fonctions amines du polymère et les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN. Ainsi, le rapport de charges et les concentrations respectives en sels, polymères et ADN sont des paramètres importants dans la formulation des polyplexes comme dans le cas des complexes lipide cationique/ADN. Cependant, pour les polyplexes, il y a un paramètre supplémentaire à prendre en compte lors de la formulation qui est le poids moléculaire du polymère, variable importante pour ce type de molécules.

Par exemple, pour des polyplexes PEI/ADN, une condensation complète de l'ADN est observée pour un rapport de charges compris entre 2 et 3 (Bieber T *et al.*, 2002). Cependant, pour obtenir une bonne efficacité de transfection, il est préférable de formuler l'ADN avec le polymère à des rapports de charges plus élevés, c'est à dire avec un excès de charges positives. En effet, l'utilisation d'un rapport de charges inférieur à 2 ne permet pas un transfert de gène efficace car les polyplexes formés à ce rapport de charge sont des particules anioniques de taille moyenne (200 à 500 nm) condensant peu l'ADN (Erbacher P *et al.*, 1999a). Au rapport de charge de 2, les polyplexes sont neutres et donc ont tendance à former des agrégats d'environ 1000

nm. En revanche, les polyplexes préparés à un rapport de charge supérieur à 2 correspondent à des objets chargés positivement, condensant l'ADN, de petite taille (environ 150 nm) qui conduisent à une forte efficacité de transfection (Bieber T *et al.*, 2002; Erbacher P *et al.*, 1999a; Tang MX and Szoka FC, 1997). Les mêmes observations ont été réalisées pour les polyplexes dendrimères fracturés/ADN et PLL/ADN (Tang MX and Szoka FC, 1997). Cependant, les polyplexes chitosan/ADN forment des complexes de plus petite taille (~100nm) excepté pour des rapports de charge de 2 où les polyplexes sont agrégés en absence de répulsion électrostatique (Erbacher P *et al.*, 1998). Quant aux potentiels zéta des différents polyplexes dendrimères/ADN, PEI/ADN et PLL/ADN, ils présentent un profil similaire quelque soit le rapport de charge. En effet, pour des rapports de charge inférieurs à 1, le potentiel zéta est négatif puis devient positif pour des rapports de charge plus élevés, jusqu'à tendre vers un plateau de +40mV à partir du rapport de charge de 3 (Figure 16). D'autres études sur le potentiel zéta ont montré des profils de courbes similaires pour d'autres polymères comme les chitosans.



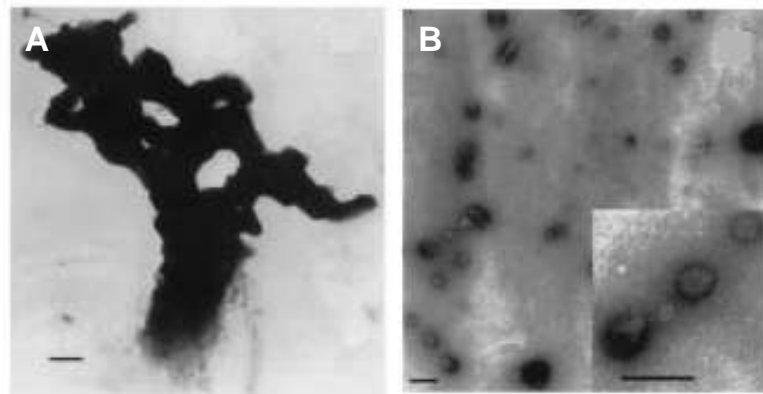
**Figure 16 : Mesures du potentiel zéta de différents polyplexes en fonction du rapport de charge.** (d'après Tang MX and Szoka FC, 1997).

#### 1.2.2.2. Effet de la concentration saline

La taille des polyplexes varie également en fonction du solvant dans lequel ils sont formés. En effet, la formation des polyplexes dans un solvant contenant une concentration physiologique en sel comme dans une solution de NaCl à 150 mM,

donne des particules de 100 à 1000 nm de diamètre( Figure 17A). Alors que ceux formés dans un milieu faiblement concentré en sels (15 mM NaCl, 5% glucose, eau) présentent une taille plus petite de l'ordre de 10 à 100 nm (Figure 17B) (Dunlap DD *et al.*, 1997; Goula D *et al.*, 1998; Ogris M *et al.*, 1998; Tang MX and Szoka FC, 1997).

L'augmentation de la taille des polyplexes PEI/ADN en présence de solutions salines concentrées pourrait être expliquée par un écrantage des charges présentes à la surface des complexes (Neu M *et al.*, 2005).

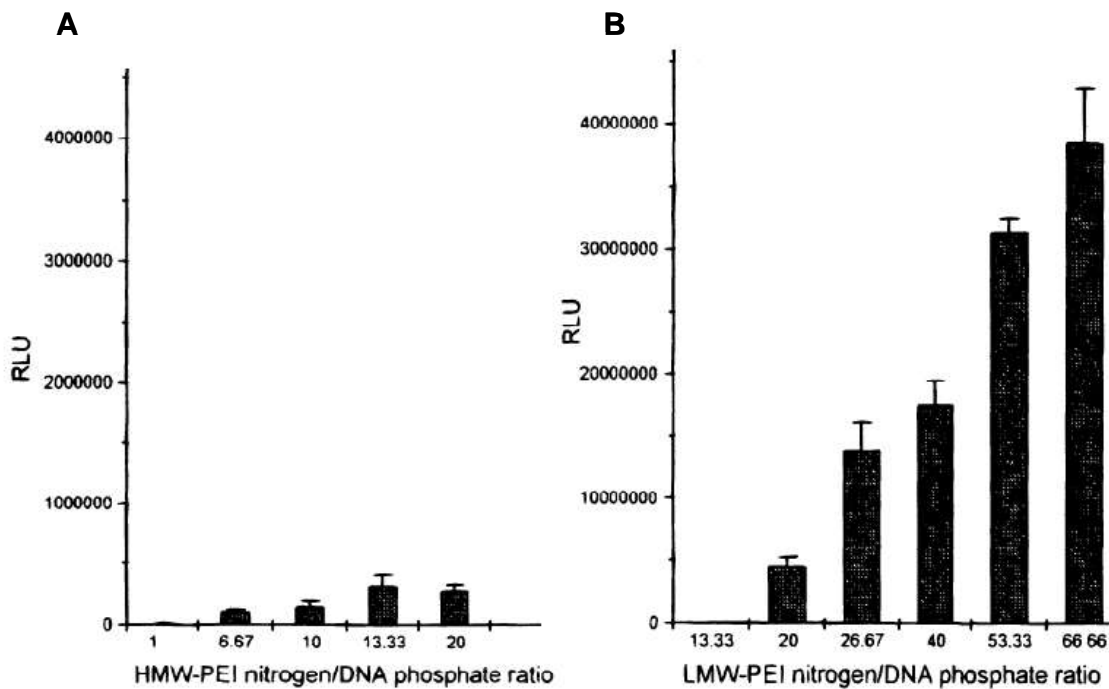


**Figure 17: Visualisation des polyplexes PEI/ADN en fonction du milieu de formulation par microscopie électronique.** Les polyplexes ont été formés à un rapport de charge de 2 soit en présence d'une solution de NaCl à 150 mM (A) soit en présence d'une solution de glucose à 5% (B). Barres d'échelle à 100 nm. (d'après Goula D *et al.*, 1998).

Ainsi, selon la nature du solvant utilisé, les polyplexes formés à un même rapport de charge présenteront des tailles différentes et conduiront donc à une efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo* variable. En effet, il a été montré que ce sont les polyplexes PEI/ADN de grande taille, qui permettaient un meilleur transfert d'ADN *in vitro* quelque soit le poids moléculaire du PEI utilisé (Ogris M *et al.*, 1998; Wightman L *et al.*, 2001). Les complexes formant de larges agrégats auraient une meilleure sédimentation dans le milieu de transfection ce qui permettrait un meilleur contact avec les cellules en culture. Par contre, pour des études *in vivo*, ce sont les complexes PEI/ADN de petites tailles qui présentent une meilleure efficacité de transfection, grâce à une meilleure diffusion des polyplexes dans l'espace extracellulaire (Goula D *et al.*, 1998; Wightman L *et al.*, 2001).

### 1.2.2.3. Effet du poids moléculaire

Le poids moléculaire joue également un rôle important au niveau de la taille et de l'efficacité des complexes polymère cationique/ADN. Par exemple, les polyplexes PEI/ADN formés à un rapport de charge compris entre 6 et 7 avec des PEI de poids moléculaire de 5kDa et 25kDa présentent des tailles différentes de l'ordre de  $587 \pm 143$  et  $156 \pm 7$  nm, respectivement. Par conséquent, l'utilisation d'un PEI de poids moléculaire plus élevé (25 kDa) permet d'obtenir des polyplexes de plus petite taille (Kunath K *et al.*, 2003). Cependant quelque soit le rapport de charge utilisé, le PEI de plus faible poids moléculaire présente une meilleure efficacité de transfection et une plus faible toxicité lors de la transfection de cellules en culture (Figure 18) (Fischer D *et al.*, 1999; Kunath K *et al.*, 2003).



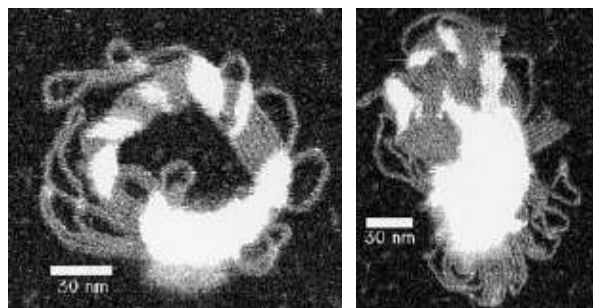
**Figure 18: Efficacité de transfection *in vitro* des PEI de haut poids moléculaire (A) et de bas moléculaire (B) complexés à l'ADN à différents rapports de charge. (d'après Fischer D *et al.*, 1999).**

L'influence de la taille des chaînes des polymères cationiques sur la condensation de l'ADN a également été testée pour la PLL par mesure de fluorescence du BET. Les PLL présentant des chaînes plus longues permettent une meilleure condensation de l'ADN (Kwoh DY *et al.*, 1999). Le poids moléculaire des polymères cationiques est donc un paramètre non négligeable à prendre en compte pour comprendre l'efficacité biologique des polyplexes.

#### 1.2.2.2.4. Morphologie des polyplexes

La structure supramoléculaire des polyplexes est très différente de celle des lipoplexes bien que des similitudes peuvent être établies entre les deux complexes pour certains paramètres comme l'influence du rapport de charge sur le potentiel zéta ou la taille des complexes.

Généralement, les polyplexes présentent une organisation structurale sphérique de type « Toroids », « Donuts » ou « Rings » ((Tang MX and Szoka FC, 1997). Plus précisément, les complexes polymère cationique/ADN formulés à partir de PEI ou de dendrimères fracturés forment des particules sphériques uniques ou quelquefois sous forme de dimère. En revanche, les polyplexes PLL/ADN et dendrimères/ADN sont souvent caractérisés par des particules sphériques en amas (Tang MX and Szoka FC, 1997). Afin d'obtenir une meilleure résolution de la structure des polyplexes, Dunlap et al. ont utilisé une autre technique de microscopie, la microscopie à effet de force (SFM) (Dunlap DD *et al.*, 1997). Pour les lipoplexes PEI/ADN, Dunlap et al. ont observé pour un même rapport de charge, différentes structures sphériques sous forme de « Donuts » mais également sous forme de boucles (« Loops ») plus ou moins compactes (Figure 19) (Dunlap DD *et al.*, 1997).

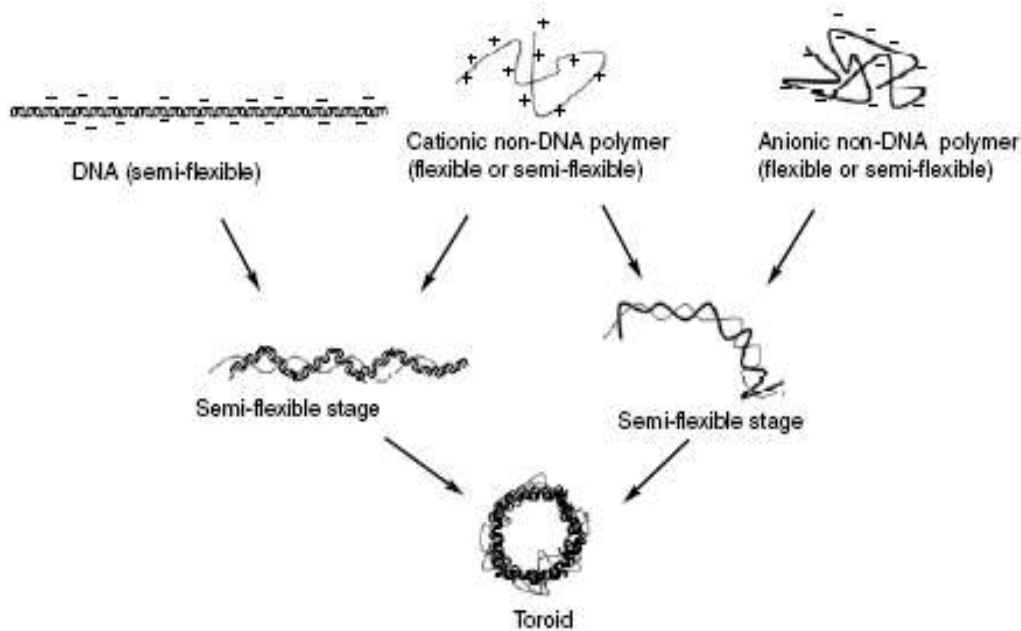


**Figure 19: Visualisation des polyplexes PEI/ADN par microscopie à effet de force.** A) Structure sphérique sous forme de « Donuts », B) Structure sous forme de « Loops » compactes (d'après Dunlap DD *et al.*, 1997).

D'autres types de structures ont également été mis en évidence en fonction de la nature du polymère cationique utilisé pour former les polyplexes. En effet, des analyses par microscopie électronique ont permis de montrer que les polyplexes de PLL/ADN formaient également des structures de type « Toroids » d'un diamètre compris entre 25 et 50 nm ou sous forme de baguettes (« Rods ») d'une longueur de 40 à 80 nm. Dans cette étude, environ 60 à 65 % des polyplexes formés se

présentent sous la forme « toroids », le reste étant des « rods » (Kwoh DY *et al.*, 1999).

Cette structure a été largement observée pour les polyplexes PLL/ADN (Golan R *et al.*, 1999; Liu G *et al.*, 2001; Wagner E *et al.*, 1991) mais également pour des polyplexes chitosan/ADN et dendrimères/ADN (Danielsen S *et al.*, 2005; Erbacher P *et al.*, 1998). La formation de ces « Toroids » en présence d'ADN semble faire intervenir la flexibilité du polymère cationique sous-entendant ainsi que seuls les polymères semi-flexibles puissent adopter une structure de type « Toroid » (Figure 20) (Tang MX *et al.*, 2005). En effet, la PLL qui est un polymère cationique d'une importante flexibilité présente entre autre une organisation structurale de type « Toroids ». Le phénomène s'expliquerait par une neutralisation du contre-ion qui induirait une rigidification du polymère cationique (Tang *et al.*, 2005).



**Figure 20: Formation des « Toroids » en présence d'ADN.** Les auteurs ont proposé un mécanisme au cours duquel l'ADN, considéré comme un polymère semi-flexible (« DNA semi-flexible »), et le polymère cationique (« Cationic non-DNA polymer ») s'assemblerait en passant par un stade semi-flexible pour donner une structure de type « Toroid » (d'après Tang MX *et al.*, 2005).

Les études réalisées sur la première génération des polyplexes pour le transfert d'ADN sont basées sur l'utilisation d'homopolymères cationiques ou de dendrimères cationiques qui ont permis d'obtenir de bonnes efficacités de transfection *in vitro*. Cependant, la taille et la stabilité des polyplexes est très sensible à la nature du



milieu dans lequel ils se trouvent et à la présence des protéines du sérum. C'est pourquoi l'utilisation des polyplexes *in vivo* s'est montrée limitée en raison de leur toxicité, de leur faible efficacité de transfection et de leur faible biodistribution. En effet, les polyplexes présentent une importante charge positive de surface qui conduit à une agrégation rapide des polyplexes dans les fluides biologiques et sont donc préférentiellement pris en charge par les cellules phagocytaires de l'organisme (Kabanov A *et al.*, 2005; Mahato RI *et al.*, 1995; Verbaan FJ *et al.*, 2001). Cette charge positive est aussi responsable de la reconnaissance des polyplexes par le système immunitaire qui conduit à leur élimination rapide de la circulation sanguine (Hwang SJ and Davis ME, 2001).

Cependant dans le cas des polyplexes PEI/ADN, cette agrégation permet de transférer majoritairement par injection systémique les poumons de souris et plus particulièrement les cellules épithéliales alvéolaires de type II. En effet, les polyplexes PEI/ADN conduisent à de forts niveaux d'expression du transgène dans les poumons (Coll JL *et al.*, 1999). Cette efficacité de transfection serait due à l'agrégation des polyplexes avec les composants du sang qui resteraient alors bloqués dans les capillaires sanguins (Ogris M *et al.*, 1999). En revanche, la transfection des cellules pulmonaires par les lipoplexes PEI/ADN n'est observée que pour de fortes concentrations d'ADN proches de la létalité. Cette transfection est associée à une nécrose des foies des animaux injectés ainsi qu'à une activation de l'endothélium pulmonaire (Chollet P *et al.*, 2002). L'expression du transgène obtenue après injection des polyplexes PEI/ADN est fortement diminuée en présence de molécules anti-agrégantes comme l'aspirine ce qui confirme que la transfection dans les poumons par ces complexes est liée à la formation de micro-thrombi (Chollet P *et al.*, 2002). Les complexes PEI/ADN sont également efficaces pour transférer des cellules tumorales après injection directe dans les tumeurs à l'aide d'une micropompe qui permet d'augmenter l'expression du transgène en terme d'efficacité et de stabilité dans le temps par rapport à une injection avec une simple seringue (Coll JL *et al.*, 1999). Par contre malgré une forte efficacité de transfection dans les poumons, les polyplexes PEI/ADN ne sont pas adaptés pour transférer des métastases pulmonaires préalablement injectées par voie systémique (Coll JL *et al.*, 1999). Les polyplexes perdent même leur capacité à transférer les cellules pulmonaires normales avec l'augmentation de la taille des tumeurs. Cette perte d'efficacité de transfection semble être liée à la présence des tumeurs qui modifient

le diamètre des capillaires pulmonaires ainsi que le débit sanguin. Les polyplexes PEI/ADN étant agrégés avec les composants sanguins, ils atteignent donc plus difficilement les cellules pulmonaires expliquant ainsi la diminution du transfert de gène. Pour limiter l'agrégation des polyplexes, des molécules de poly(éthylène-glycol) (PEG) peuvent être liées de façon covalente au PEI ce qui implique une diminution de la densité de charge de surface (Erbacher P *et al.*, 1999a).

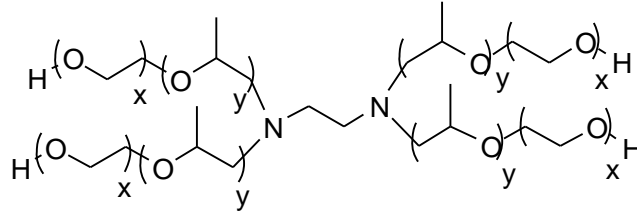
Plusieurs équipes ont également diminuer la charge de surface des polyplexes en développant une seconde génération de polymères, les copolymères cationiques (Choi, Y.H. *et al.*, 1998; Katayose S and Kataoka K, 1997; Maruyama A *et al.*, 1997; Vinogradov SV *et al.*, 1998). Ces molécules sont des copolymères à blocs constitués de groupements non-ioniques hydrophiles, comme des poly(éthylène oxyde) (PEO) ou des poly(N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide) (PHPMA), conjugués à un polycation comme une polyspermine (Kabanov AV and Kabanov VA, 1995), une PLL (Choi, Y.H. *et al.*, 1998) ou un PEI (Kircheis R *et al.*, 2001b; Nguyen HK *et al.*, 2000; Vinogradov SV *et al.*, 1998). Les interactions électrostatiques entre ces copolymères cationiques et l'ADN ont conduit à former des complexes hydrophiles peu chargés, dans lesquels le cœur est constitué d'ADN neutralisé par les polycations et la surface du complexe est constituée de chaînes non ioniques hydrophiles. Cependant, ces complexes n'ont pas amélioré l'efficacité de transfection de l'ADN plasmidique, qui peut s'expliquer par la présence des chaînes non-ioniques en surface qui empêche l'interaction des complexes copolymère cationique/ADN avec les membranes cellulaires (Nguyen HK *et al.*, 2000). C'est pourquoi de nouveaux vecteurs synthétiques plus efficaces ont été développés pour le transfert de gène *in vivo*.

### **1.2.3. Les copolymères à blocs**

Les copolymères à blocs sont des molécules synthétisées par addition séquentielle de monomères d'oxyde de propylène (OP) et d'oxyde d'éthylène (OE) en présence d'un catalyseur alcalin. Les copolymères à blocs sont recensés par les pharmacopées britannique et américaine sous le nom de poloxamères ou pluronics<sup>®</sup> pour les copolymères à blocs non ioniques, et poloxamines ou tetronics<sup>®</sup> pour les copolymères à blocs ioniques. Il existe plus de 50 polymères différents.

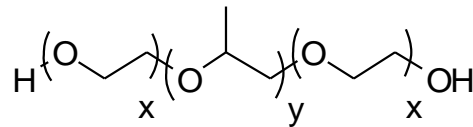
### 1.2.3.1. Structure des copolymères à blocs

Les poloxamines sont des copolymères à blocs amphiphiles constitués de quatre blocs OP/OE reliés entre eux par un groupement éthylène diamine central chargé positivement (Figure 21).



**Figure 21: Représentation schématique et composition des copolymères à blocs ioniques composés d'OE et d'OP.** La masse moléculaire et le nombre d'OE et OP définissent la structure des différents polymères. (d'après Pitard B et al., 2004).

Les poloxamères sont des copolymères à blocs amphiphiles constitués de blocs hydrophiles d'oxyde d'éthylène (OE) et hydrophobes d'oxyde de propylène (OP) arrangés selon une structure triséquencée de type A-B-A : EO<sub>x</sub>-OP<sub>y</sub>-EO<sub>x</sub> (Figure 22).



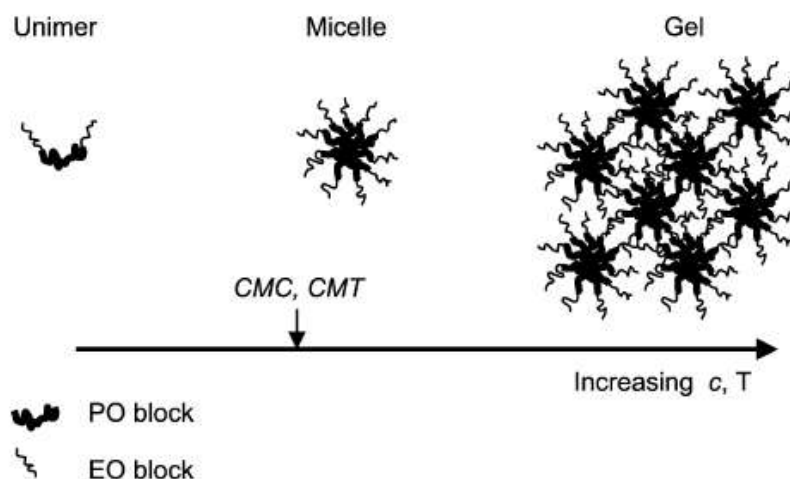
**Figure 22: représentation schématique des poloxamères constitués d'OE et d'OP.**

Cette structure triséquencée est caractéristique de nombreux poloxamères présentant des tailles et des comportements hydrophiles et lipophiles différents (Batrakova EV et al., 2003). Les poloxamères sont en effet caractérisés par leur masse moléculaire (MW), leur balance hydrophile-lipophile (HLB) et leur concentration critique micellaire (CMC). La nomenclature correspond à des lettres F (pour solide), P (pour pâte) ou L (pour liquide) suivies de deux ou trois numéros qui correspondent à des paramètres structuraux (Tableau 2). Le dernier chiffre représente le pourcentage molaire des unités OE par rapport à la masse molaire totale du polymère. Le premier ou les deux premiers chiffres multipliés par 300 correspondent à la masse moléculaire des blocs OP.

Poloxamère	Masse molaire	Nombre d'unités OE	Nombre d'unités OP	HLB	CMC ( $\mu\text{M}$ )
P184 (L64)	2900	26	30	15	480
P188 (F68)	8400	152	28	29	480
P85	4600	52	39	16	65
P407 (F127)	12600	200	65	22	2.8
F108	14600	254	50	27	22

**Tableau 2: Caractéristiques physico-chimiques de certains poloxamères à 37°C.** (Modifié d'après Kabanov AV et al., 2002).

En effet, les poloxamères existent sous différentes formes en solution. Pour des concentrations en dessous de la concentration critique micellaire (CMC), les poloxamères se dispersent en solution sous forme d'unimères. En revanche au-delà de la CMC, les unimères s'agrègent et forment majoritairement des micelles par interactions hydrophobes (Figure 23). Ces micelles sont communément représentées par des sphères composées d'un cœur hydrophobe d'OP et d'une couronne hydrophile d'OE (Kabanov AV et al., 2002).



**Figure 23 : Structure des copolymères à blocs selon la concentration critique CMC et la température critique micellaire CMT.** (d'après Kabanov A et al., 2005).

En solution aqueuse, la formation des micelles dépend également de la température. En dessous de la température critique micellaire (CMT), les poloxamères sont hydratés et relativement solubles, en revanche lorsque la température augmente, les groupements OP se déshydratent et deviennent insolubles permettant ainsi la formation de micelles. Des gels peuvent également être observés pour des valeurs seuils de concentration ainsi que pour des températures encore supérieures à la CMT. Pour la plupart des poloxamères, la CMT est comprise entre 25 et 40°C, c'est-à-dire en dessous ou proche de la température corporelle. La structure du polymère a de profonds effets sur les processus de micellisation et de gélification. Plus le nombre d'OP est grand, plus la formation de micelles ou de gels se fait rapidement, ce qui se traduit par des valeurs de CMC et de CMT plus faibles. Au contraire, plus le nombre d'OE est important, moins les unimères auront tendance à s'agréger.

### **1.2.3.2. Applications et activités biologiques**

Depuis les années 1950, ces molécules sont utilisées pour de nombreuses d'applications pharmaceutiques et biomédicales (Moghimi SM and Hunter AC, 2000). Par exemple, certains poloxamères peuvent être utilisés en pharmacie comme excipients ce qui permet d'augmenter la stabilité de la durée de vie de certaines drogues ou molécules hydrophobes dans la circulation sanguine. Des études récentes ont montré que le poloxamère P188 permet une augmentation de la biodisponibilité de certaines drogues dans le cerveau après administration par voie orale et ce grâce à l'interaction de ces drogues avec le cœur des micelles formées par le poloxamère par l'intermédiaire de liaisons non covalentes (Kabanov AV *et al.*, 2002; Kabanov AV *et al.*, 2005).

Dans certaines émulsions eau-huile, les poloxamères présentent des propriétés adjuvantes (Moghimi SM and Hunter AC, 2000). Il a été montré que l'addition de copolymères à blocs, administrés par voie intraveineuse, en présence d'antigènes permettait d'amplifier les réponses immunes humorales et cellulaires contre les antigènes. L'activité adjuvante des copolymères à blocs semble être modifiée selon la taille et le nombre d'OE. L'activité maximale a été obtenue avec des copolymères dont la taille moléculaire varie entre 10 et 12kDa avec un nombre d'OE oscillant entre 5 et 15% de la masse moléculaire. De plus, le nombre d'OP semblerait diriger le type de réponse immune. Par exemple, les copolymères à blocs comprenant 10%

d'OP augmentent de façon significative les réponses lymphocytaires de type TH2 alors que les copolymères à blocs présentant peu d'OP induisent à la fois des réponses lymphocytaires de type TH1 et TH2. Le ou les mécanismes par lesquels les copolymères à blocs auraient un rôle adjuvant restent encore à élucider. Il semblerait néanmoins qu'ils facilitent le chargement de peptides antigéniques sur les molécules du complexe d'histocompatibilité CMH de classe II des macrophages et des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) en déstabilisant leur membrane plasmique ou la membrane des vacuoles (pinosomes ou phagolysosome). En effet, le P188 (F68) a été décrit comme pouvant stimuler l'activité phagocytaire des neutrophiles humains et des macrophages tissulaires de rongeurs (Ingram DA *et al.*, 1992; Moghimi SM and Gray T, 1997). De plus, des études récentes ont montré que les poloxamères inhibent les mécanismes de résistance aux drogues. Les polymères altèrent la viscosité membranaire en se liant aux membranes cellulaires et inhibent ainsi certaines protéines membranaires telle que la P-glycoprotéine (Pgp) (Batrakova EV *et al.*, 2003; Batrakova EV *et al.*, 2001a; Batrakova EV *et al.*, 2001b). En plus d'augmenter la biodisponibilité de certaines drogues, ils induisent une sensibilisation des tumeurs dites multi-drogues résistantes (MDR) (Kabanov AV *et al.*, 2002). Les copolymères à blocs sont donc dotés de nombreuses activités biologiques (Moghimi SM and Hunter AC, 2000).

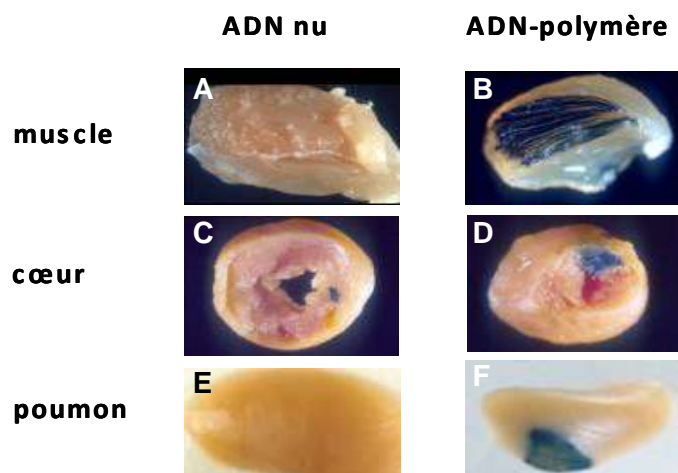
### **1.2.3.3. Copolymères à blocs et transfert de gène**

L'utilisation de ces composés s'est étendue au transport de macromolécules comme l'ADN. Ils sont aujourd'hui reconnus à part entière comme une nouvelle classe de vecteurs synthétiques pour le transfert de gène non viral *in vivo*, dans de divers organes tel que le cœur (Pitard B *et al.*, 2004), les poumons (Desigaux L *et al.*, 2005), le muscle squelettique (Lemieux P *et al.*, 2000; Pitard B *et al.*, 2004; Pitard B *et al.*, 2002b), les yeux (Liaw J *et al.*, 2001) ou encore les intestins (Chang SF *et al.*, 2004).

Les copolymères à blocs ont d'abord été utilisés pour augmenter l'efficacité de transfection des adénovirus et des lentivirus (Dishart KL *et al.*, 2003; Maillard L *et al.*, 2000). En effet, le gel formé par le poloxamère 407 (Pluronic F127) sert de réservoir pour les virus et permet donc d'augmenter l'efficacité du transfert de gène en maintenant une concentration suffisante de vecteurs autour des cellules cibles (March 1995). Ensuite, des études ont montré que ces vecteurs co-délivrés avec des

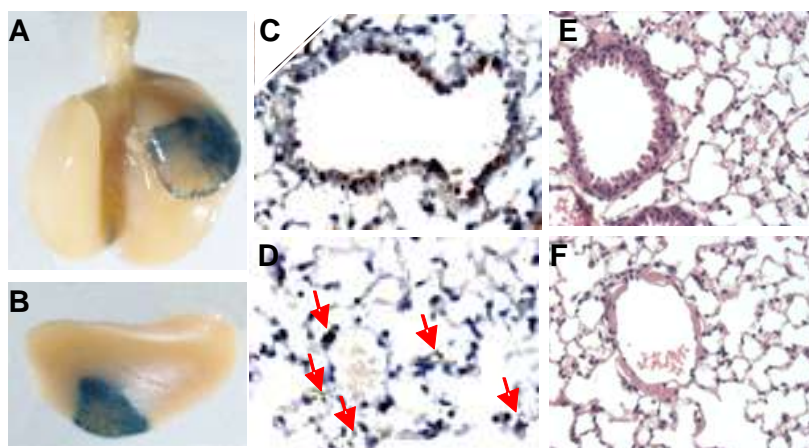
polymères cationiques permettaient d'améliorer le transfert de gène *in vitro* (Gebhart CL *et al.*, 2002). Dans ce cas, il a été suggéré que le poloxamère faciliterait l'internalisation des complexes polymère cationique/ADN par endocytose (Astafieva I *et al.*, 1996). Dans cette étude, les auteurs supposent que le poloxamère interagit avec les motifs hydrophobes des polyplexes formés par l'ADN et le polymère cationique. Kuo et al. ont également mis en évidence que les poloxamères à une certaine concentration (1 à 3 % v/w dans l'eau) amélioreraient le transfert de gène des polyplexes PEI/ADN (Kuo JH, 2003). En effet, les polyplexes ont une charge globale positive qui entraîne leur fixation aux protéines sériques du milieu de culture par interactions électrostatiques. Les polyplexes s'agrègent, ils conduisent à une faible efficacité de transfection. Cependant, l'addition de poloxamères aux complexes vecteur cationique/ADN permet d'améliorer l'efficacité de transfection en s'insérant dans les complexes. Les chaînes hydrophiles d'OE des copolymères à blocs provoqueraient une dispersion des complexes et préviendraient ainsi leur agrégation (Pitard B *et al.*, 2001).

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



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

En effet, les copolymères à blocs ont permis d'améliorer significativement l'expression du transgène dans des poumons de souris après injection intratrachéale (Figure 25 A et 25B) par rapport à des vecteurs synthétiques couramment utilisés pour le transfert de gène dans le tissu pulmonaire tel que le PEI. Le transgène est exprimé au niveau des cellules épithéliales et alvéolaires ainsi qu'au niveau de la trachée des poumons injectés avec les complexes copolymères à blocs/ADN (Figure 25C et 25D). Ces vecteurs sont capables de véhiculer de fortes concentrations d'ADN contrairement aux vecteurs cationiques qui sont instables colloïdalement pour des concentrations d'ADN élevées ce qui limite leur utilisation *in vivo* (Pitard B *et al.*, 2001). La formulation copolymères à blocs/ADN conduit également à une expression stable du transgène jusqu'à 5 jours après l'injection, alors que la plupart des vecteurs non viraux présentent une expression maximale du transgène dans les poumons, 1 à 2 jours après délivrance puis diminue fortement pour atteindre des valeurs très basses à 4 ou 5 jours après la transfection (Dean DA *et al.*, 2003a; Yew NS *et al.*, 2001). De plus, les poumons de souris injectés avec les complexes copolymères à blocs/ADN ne présentent aucun signe de toxicité que se soit au niveau des bronches (Figure 25E) ou des vaisseaux sanguins (Figure 25F), contrairement aux complexes PEI/ADN qui induisent une forte inflammation des bronches ainsi qu'un important infiltrat cellulaire pour une même quantité d'ADN transférée (Desigaux L *et al.*, 2005). Par conséquent, ces nouveaux vecteurs sont efficaces et non toxiques pour le transfert de gène dans les poumons.



**Figure 25: Expression du gène rapporteur et analyses histopathologiques de poumons de souris, 48h après injection en intra-trachéale des complexes copolymères à blocs/ADN.** (A,B) Visualisation macroscopique des poumons instillés avec un plasmide codant la  $\beta$ -galactosidase formulé aux copolymères à blocs. Immunomarquage de la chloramphénicol-acétyltransférase (CAT) dans des poumons de souris au niveau des bronches (C) et du parenchyme (D). Analyses histopathologiques des poumons de souris au niveau des bronches et des vaisseaux sanguins pulmonaires (F).



Les complexes copolymères à blocs/ADN sont également capables de conduire à l'expression de gènes thérapeutiques tels que l'érythropoïétine après une injection en intramusculaire (Richard P *et al.*, 2005b; Richard-Fiardo P *et al.*, 2008). Les premiers traitements médicaux à base de protéine dataient des années 70-80. Il s'agissait de protéines dites d'extraction, prélevées dans des tissus ou organes et ré-administrées aux individus malades. Cette première génération de protéine a vite été remplacée par des protéines recombinantes, issues du génie génétique, plus fiables et dont la production à l'échelle industrielle est possible. Mais les traitements actuels sont souvent contraignants pour les patients et ne sont pas totalement satisfaisants. C'est notamment le cas dans l'insuffisance rénale. Le mauvais fonctionnement d'un rein engendre un déficit de production d'EPO, une hormone naturellement produite par cet organe qui est indispensable à la synthèse des globules rouges. Sans EPO, et donc sans globules rouges en quantité suffisante, l'organisme se retrouve en anémie. Le traitement actuel consiste à injecter des doses régulières d'EPO recombinante. Mais cette technique pose le problème majeur de la disparition très rapide de la protéine de l'organisme (d'où la nécessité de répéter les injections plusieurs fois par semaine pendant toute la durée du traitement).

Notre équipe a donc mis au point un nouveau modèle de traitement en utilisant directement les cellules musculaires de l'individu à traiter pour assurer leur propre synthèse d'EPO. Cette nouvelle méthode consiste en l'injection intramusculaire d'un vecteur de très petite taille transportant le gène de l'EPO. Ce vecteur de nouvelle génération est capable de passer au travers des défenses immunitaires et des membranes cellulaires et délivre la séquence d'ADN au coeur du muscle qui peut alors produire naturellement l'hormone thérapeutique.

Chez des souris normales, cette méthode a permis d'augmenter le taux d'hématocrite (volume des globules par rapport au volume sanguin total) de plus de 30%. Cette nouvelle méthode de fabrication a été également validée dans un modèle animal d'insuffisance rénale rétablissant le taux d'hématocrite à des valeurs normales avoisinant les 50%. De plus, l'expression de l'EPO est prolongée, ce qui permet un maintien du taux d'hématocrite stable pendant au moins 9 mois après seulement 2 à 4 injections, alors que l'utilisation de l'EPO recombinante nécessite plusieurs injections par semaine pendant toute la durée du traitement. Ce nouveau système de délivrance dans l'organisme ouvre la voie à toute une nouvelle

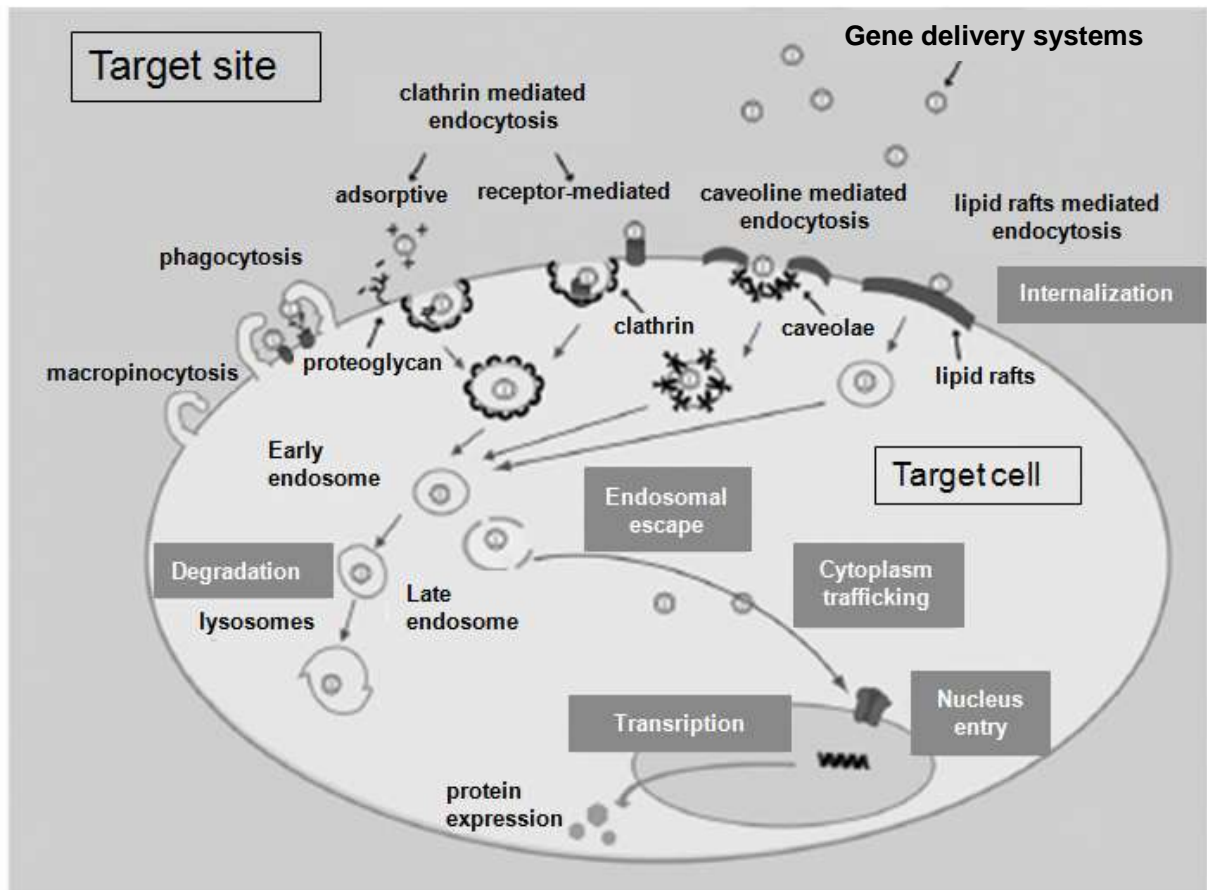
génération de protéines thérapeutiques pour le traitement de pathologies héréditaires ou acquises de déficit en protéine.

Les copolymères à blocs sont donc des vecteurs synthétiques efficaces pour le transfert de gène *in vivo*. Cependant, ils ne conduisent qu'à une faible transfection *in vitro* sur des cellules en culture. En revanche, les lipides cationiques présentent un comportement opposé à celui des copolymères à blocs puisqu'ils conduisent à une forte efficacité de transfection *in vitro* et à une faible expression du transgène *in vivo*, qui est même inférieure à celle obtenue avec l'ADN nu. Les polymères cationiques tel que le PEI assurent une bonne efficacité de transfection à la fois *in vitro* et *in vivo* mais induisent une certaine toxicité de par leur forte densité de charge positive. Néanmoins, les vecteurs synthétiques présentent un potentiel prometteur dans le domaine du transfert de gène. Cependant, la vectorisation d'acides nucléiques implique de nombreuses barrières cellulaires que devront franchir les complexes vecteur synthétique/ADN pour délivrer l'ADN jusqu'au noyau des cellules cibles et assurer ainsi la production de la protéine manquante ou thérapeutique. La compréhension de ces étapes est indispensable pour la conception de nouveaux systèmes synthétiques mieux adaptés au transfert de gène *in vitro* et *in vivo*.

## **2. Les différentes étapes cellulaires impliquées dans le transfert de gène**

L'internalisation des acides nucléiques dans la cellule cible se déroule en plusieurs étapes (Figure 26). La première étape consiste à former des complexes (lipoplexes ou polyplexes) compacts et résistants à la dégradation par les nucléases. Ces complexes doivent ensuite se lier à la membrane plasmidique des cellules cibles de façon non spécifique (ciblage passif) ou spécifique via un récepteur membranaire (ciblage actif) puis être internalisés. En fonction de la voie d'internalisation activée, les complexes sont contenus dans des vésicules ou des vacuoles desquelles ils doivent s'échapper pour gagner le cytosol (échappement endosomal). Enfin l'ADN doit migrer vers le noyau et entrer dans celui-ci pour y être transcrit et conduire enfin à la production de la protéine thérapeutique dans le cytoplasme, étape ultime de la transfection *in vivo* (Figure 26). L'efficacité de la transfection repose donc sur la capacité des vecteurs synthétiques à franchir chacune de ces étapes tout en préservant l'activité biologique du matériel génétique transporté.

La première étape cellulaire de la transfection est l'internalisation des complexes au sein de la cellule cible par endocytose spécifique ou non spécifique. Une simple fusion avec la membrane plasmique peut également avoir lieu ce qui aboutit à l'internalisation directe des complexes dans le cytosol de la cellule (Figure 26).



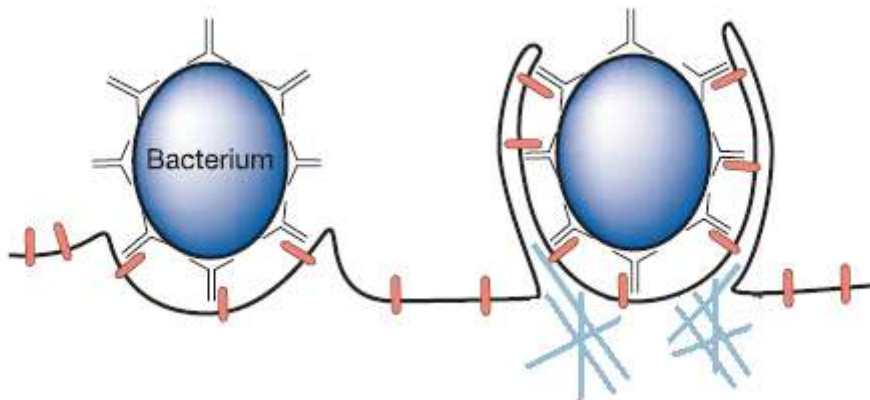
**Figure 26 : Les principales étapes du trafic intracellulaire des complexes vecteur synthétique/ADN.** (d'après Morille M et al., 2008).

### 2.1. Les différentes voies d'internalisation

L'internalisation des complexes peut dépendre de plusieurs voies d'endocytose qui sont réparties en deux catégories : la phagocytose ou processus « d'ingestion » impliquant l'internalisation de larges particules et la pinocytose ou « endocytose en phase fluide » correspondant à l'internalisation de solutés ou de petites particules. Ces voies endocytaires peuvent coexister dans une même cellule et les différentes vésicules formées peuvent être dirigées vers un même organe.

### 2.1.1. La phagocytose

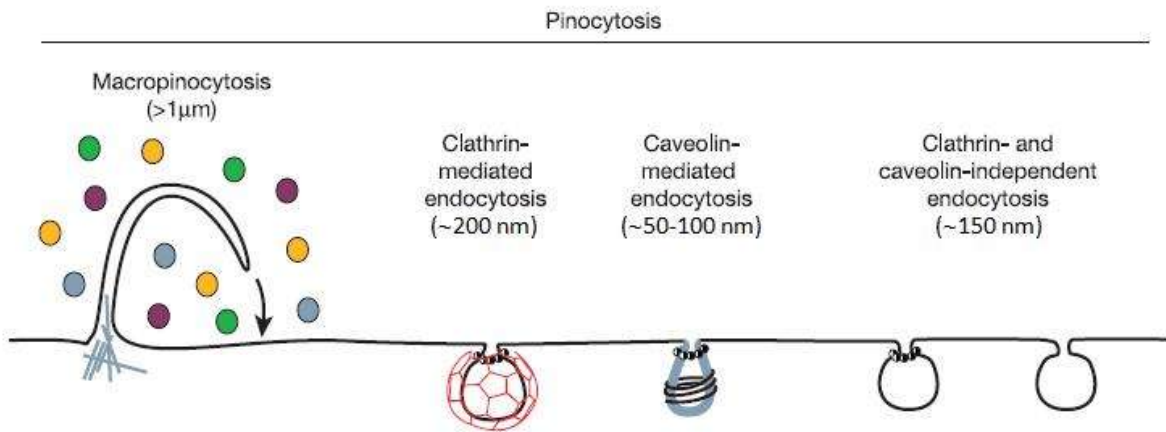
La phagocytose correspond à un processus d'internalisation de larges particules comme des bactéries, qui sont reconnues par des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules phagocytaires. Les récepteurs les plus connus sont les récepteurs au mannose (CD206) qui reconnaît les résidus mannosyles des mannoprotéines présentes sur la paroi bactérienne, les récepteurs aux intégrines et le récepteur  $Fc\gamma$  qui reconnaît le domaine Fc des IgG et E (Aderem A and Underhill DM, 1999; Conner SD and Schmid SL, 2003). La phagocytose est déclenchée par une reconnaissance ligand-récepteur, qui conduit à la formation d'expansions membranaires appelées pseudopodes, qui entourent la particule à internaliser et fusionnent par leurs extrémités pour former des phagosomes, vacuoles de plus de 500 nm de diamètre (Figure 27). Les phagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes pour donner les phagolysosomes dont le contenu est dégradé avant d'être éliminé à l'extérieur de la cellule. Ce processus dépend du cytosquelette de la cellule et plus particulièrement des filaments d'actine. Elle a essentiellement lieu dans les cellules phagocytaires qui jouent un rôle dans la défense de l'organisme comme les macrophages ou les leucocytes.



**Figure 27: Représentation schématique de la phagocytose.** Les filaments d'actine sont représentés en bleu ciel et les récepteurs en rose. (Modifié d'après Conner SD and Schmid SL, 2003).

### 2.1.2. La pinocytose

La pinocytose comprend quatre mécanismes d'internalisation, la macropinocytose, la micropinocytose et l'endocytose clathrine-dépendante ou cavéole-dépendante (Conner SD and Schmid SL, 2003) (Figure 28).



**Figure 28: Représentation schématique de la macropinocytose, de l'endocytose clathrine-dépendante et cavéole-dépendante ainsi que de la micropinocytose. (d'après Conner SD and Schmid SL, 2003).**

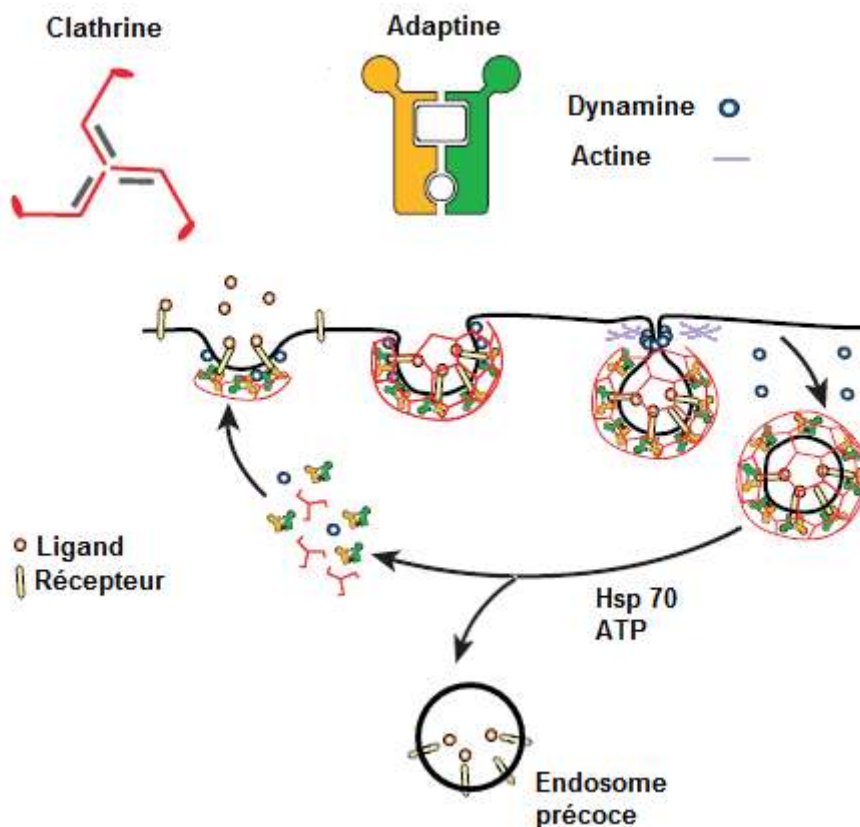
#### 2.1.2.1. La macropinocytose

La macropinocytose est une endocytose induite par stimulus. Elle permet l'entrée de macromolécules de grande taille comme les bactéries ou les virus ((Hacker U et al., 1997; Maréchal V et al., 2001; Watarai M et al., 2001). Elle aboutit à la formation de vacuoles non recouvertes, très hétérogènes, de grande taille de l'ordre de 0,5 à 500 µm appelées macropinosomes formées par extensions membranaires comme pour la phagocytose (Figure 28). Comme pour la phagocytose, l'internalisation dépend du cytosquelette et plus précisément des filaments d'actine (Lee E and Knecht DA, 2002) mais la nature du processus d'internalisation n'est pas encore bien établie.

#### 2.1.2.2. L'endocytose clathrine-dépendante

L'endocytose clathrine-dépendante est une endocytose hautement spécifique qui est induit par une reconnaissance ligand-récepteur aboutissant à la formation de vésicules d'environ 200 nm de diamètre recouvertes de clathrine. Une fois le ligand fixé aux récepteurs, ces derniers se regroupent et forment une dépression de la membrane plasmique qui conduit à la formation de puits recouverts des complexes moléculaires adaptine/clathrine appelés « coated pit ». La membrane des puits

recouverts de clathrine s'invagine ensuite grâce aux forces développées par l'association des molécules de clathrine avec d'autres protéines comme l'actine. L'invagination des puits se referme grâce à la dynamine et aboutit alors à la formation de vésicules d'endocytose recouvertes des complexes clathrine/adaptine. Ces vésicules se déplacent ensuite dans le cytosol grâce à la dépolymérisation des microtubules. Les vésicules d'endocytose perdent ensuite les molécules de clathrine et d'adaptine en présence d'ATP sous l'action d'une ATPase de déshabillage clathrine-dépendante (protéine chaperonne Hsp 70), puis forment des endosomes précoces contenant les complexes ligand-récepteur endocytés (Figure 29). Ces complexes sont soit recyclés soit dégradés par les lysosomes.



**Figure 29: Schéma détaillé de l'endocytose clathrine-dépendante induite par la reconnaissance ligand-récepteur.** (Modifié d'après Conner SD and Schmid SL 2003).

### 2.1.2.3. L'endocytose cavéole-dépendante

L'endocytose cavéole-dépendante est également caractérisée par une reconnaissance ligand-récepteur. Ce type d'endocytose conduit à la formation de vacuoles, appelées cavéoles de 50 à 100 nm de diamètre constituées

essentiellement de cavéoline mais également de cholestérol et de sphingolipides (Figure 28) (Medina-Kauwe LK *et al.*, 2005). Les cavéoles internalisent généralement de larges complexes moléculaires, des toxines, des bactéries et certains virus (Parton RG and Richards AA, 2003). Cependant, le devenir des cavéoles dans la cellule dépend de la nature des ligands internalisés (Pelkmans L *et al.*, 2001). En effet, les cavéoles peuvent soit rester attachées à la membrane plasmique soit former des vésicules. Ces vésicules contenant les complexes ligand-récepteur retournent soit à la membrane plasmique pour y être recyclées, soit sont dirigées vers le réticulum endoplasmique (RE) ou vers d'autres organites comme l'appareil de Golgi pour y déverser leur contenu. Ces vésicules peuvent également évacuer directement leur contenu dans le cytosol ou traverser la cellule (transcytose) pour le libérer par exocytose dans le milieu extracellulaire.

Par exemple, il a été montré que le transport direct du virus SV40 de la membrane plasmique au RE utilise la voie d'entrée par endocytose cavéole-dépendante (Cohen AW *et al.*, 2004). Après internalisation, le virus est retrouvé dans des vésicules endosomales marquées à la cavéoline appelées cavéosomes. A partir des cavéosomes, les substances internalisées sont distribuées au niveau du réticulum endoplasmique grâce aux microtubules. Cependant, le mécanisme permettant au génôme viral de passer du RE au noyau reste inconnu (Pelkmans L *et al.*, 2001).

#### **2.1.2.4. La micropinocytose**

La micropinocytose est une endocytose non spécifique de fluides et de solutés qui aboutit à la formation de vésicules lisses non recouvertes de clathrine d'environ 150 nm de diamètre (Nichols BJ and Lippincott-Schwartz J, 2001). Le devenir de ces vésicules n'est pas encore bien établi ; soit elles forment des endosomes précoces, soit elles se déplacent à travers la cellule (transcytose) pour libérer leur contenu par exocytose dans le milieu extracellulaire.

Afin de déterminer les voies d'endocytose empruntées par les complexes vecteur synthétique/ADN, différents inhibiteurs ou activateurs spécifiques de chaque voie peuvent être utilisés (Benmerah A and Lamaze C, 2002). Par exemple, l'utilisation de chlorpromazine qui est un inhibiteur pharmacologique permet d'étudier spécifiquement l'endocytose clathrine-dépendante. La filipine quant à elle inhibe

sélectivement l'internalisation par les cavéoles (endocytose cavéole-dépendante) en se liant au cholestérol de la membrane plasmique.

Les voies d'internalisation des complexes vecteur synthétique/ADN ont été principalement étudiées pour les lipides et polymères cationiques :

Dans le cas des complexes lipide cationique/ADN, l'endocytose se ferait principalement par phagocytose (Labat-Moleur F *et al.*, 1996). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la phagocytose, la cytochalasine B (Pratten MK and Lloyd JB, 1986) a conduit à une diminution de l'efficacité de transfection. D'autre part, d'autres études ont montré que l'endocytose par pinocytose et par endocytose clathrine-dépendante était également une voie utilisée par les lipoplexes (Labat-Moleur F *et al.*, 1996; Zabner J *et al.*, 1995; Zuhorn IS *et al.*, 2002). Les complexes polymère cationique/ADN sont également internalisés majoritairement par pinocytose (Bieber T *et al.*, 2002; Mislick KA and Baldeschwieler JD, 1996) mais des études ont montré que l'internalisation des polyplexes se faisait plus précisément par phagocytose et par endocytose clathrine-dépendante (Erbacher P *et al.*, 1999a).

### **2.2. L'échappement endosomal des complexes vecteur synthétique/ADN**

Une fois internalisés, les complexes doivent encore franchir de nombreuses barrières cellulaires dont l'échappement endosomal qui représente une étape limitante dans le processus de transfection et notamment pour les complexes vecteur/ADN présentant un ligand, qui sont internalisés par endocytose clathrine-dépendante (Medina-Kauwe LK *et al.*, 2005). En effet, il a été montré que les vecteurs synthétiques fonctionnalisés par un ligand permettaient un important niveau d'internalisation des complexes mais leur efficacité de transfection restait faible. Par conséquent, pour permettre un transfert de gène efficace, les complexes endocytés doivent être capables de s'échapper des endosomes précoces pour pouvoir atteindre le noyau sans être dégradés ou exocytés. Les vecteurs synthétiques doivent donc posséder une activité endosomolytique intrinsèque comme le PEI ou les lipopolyamines ou être transfectés en présence d'agents endosomolytiques tels que la DOPE, les peptides fusogènes ou la chloroquine.



### **2.2.1. Les agents endosomolytiques**

#### **2.2.1.1. Les lipides déstabilisants**

La DOPE est un phospholipide neutre qui présente des propriétés fusogènes permettant de déstabiliser la membrane des endosomes (Farhood H *et al.*, 1995; Mui B *et al.*, 2000). La DOPE est généralement associée à certains lipides cationiques comme le BGTC pour améliorer leur efficacité de transfection (Oudrhiri N *et al.*, 1997a; Tucker TA *et al.*, 2003).

#### **2.2.1.2. Les agents lysosomotropiques**

La choroquine est une base faible non chargée à pH neutre qui se protone à pH acide (pH=5,5). Elle est généralement utilisée *in vitro* dans le milieu de transfection où elle est capable de traverser facilement les membranes cellulaires sous sa forme neutre. Une fois dans les cellules, elle s'accumule dans les compartiments acides qu'elle neutralise, inhibant ainsi l'activité des enzymes lysosomales. Elle est souvent employée avec la PLL qui est un polymère cationique présentant une faible activité endosomolytique intrinsèque (Pouton CW *et al.*, 1998; Wagner E *et al.*, 1992). Elle permet ainsi de protéger les polyplexes contre la dégradation et augmenter ainsi leur efficacité de transfection. Cependant, l'utilisation de choroquine *in vivo* est difficilement applicable.

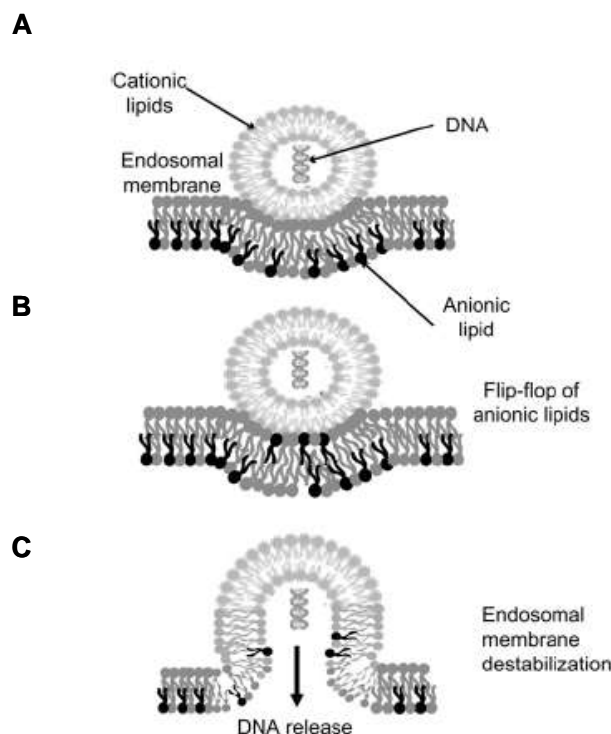
#### **2.2.1.3. Les peptides fusogènes**

Les peptides fusogènes sont en général composés de régions d'acides aminés hydrophobes alternant avec des régions d'acides aminés hydrophiles. Ainsi, lorsque les complexes vecteur synthétique/ADN liés aux peptides se retrouvent dans les endosomes, les peptides sont capables à pH acide de changer de conformation pour former une hélice  $\alpha$  dont la surface est constituée des régions hydrophobes. Cette nouvelle conformation permet aux peptides d'interagir avec les phospholipides membranaires des endosomes ce qui induit la déstabilisation des membranes endosomales, la lyse des endosomes puis la libération des complexes dans le cytosol (de Lima MC *et al.*, 1999).

### 2.2.2. Libération du matériel génétique

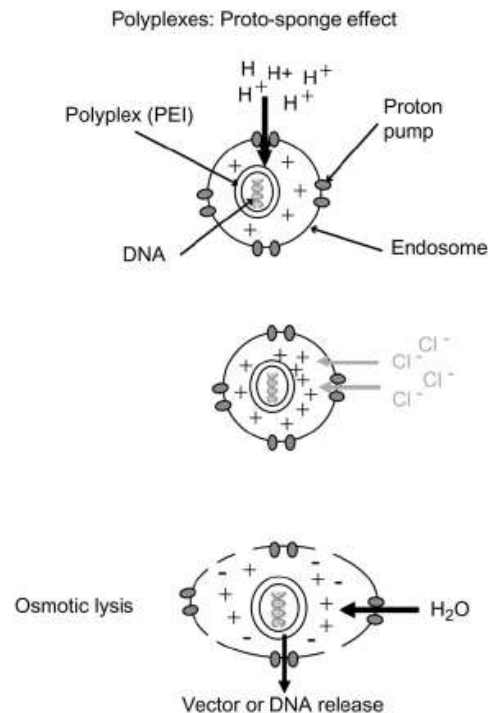
Deux hypothèses ont été suggérées pour expliquer les mécanismes impliqués dans l'échappement endosomal des lipoplexes et des polyplexes (Morille M *et al.*, 2008).

Le mécanisme d'échappement des lipoplexes passerait par une déstabilisation des membranes endosomales (Figure 30). Les interactions électrostatiques entre les lipides cationiques des lipoplexes et les lipides anioniques de la membrane des endosomes induiraient un phénomène de « flip-flop » qui déstabiliserait à la fois les lipoplexes et les membranes des endosomes permettant ainsi la diffusion de l'ADN plasmidique (Xu Y and Szoka FC Jr, 1996; Zelphati O and Szoka FC Jr, 1996). Ce phénomène est caractérisé par le déplacement des lipides anioniques de la face cytoplasmique vers la face interne des endosomes. La formation de paires d'ions neutres avec les lipides cationiques des lipoplexes et les lipides anioniques des endosomes conduit à la décomplexation des lipoplexes et au relargage de l'ADN dans le cytoplasme.



**Figure 30: Mécanisme d'échappement endosomal des lipoplexes.** Les lipoplexes endocytés déstabilisent la membrane des endosomes en induisant un « flip » des lipides anioniques de la face cytoplasmique vers la face interne des endosomes (B). Les lipides anioniques forment alors des paires d'ions neutres avec les lipides cationiques qui conduisent à la libération de l'ADN dans le compartiment cytoplasmique (C). (d'après. Xu Y and Szoka FC Jr, 1996).

Dans le cas des polyplexes constitués de polymères cationiques présentant une activité endosomolytique intrinsèque tels que le PEI ou le dendrimère polyamidoamine, l'échappement endosomal serait expliqué par un mécanisme « d'éponge à protons » (Figure 31).



**Figure 31: Mécanisme d'échappement endosomal des polyplexes par l'effet "éponge à protons".** Les fonctions amines non protonées du PEI tamponne le milieu acide des endosomes ce qui provoque une augmentation de la pression osmotique, la lyse de l'endosome et la libération des polyplexes dans le cytoplasme. (d'après Kichler A et al., 2001).

En effet, ces polymères possèdent de nombreux groupements amines non protonés à pH physiologique qui permettent de tamponner le milieu acide des endosomes. De plus, les endosomes possèdent des pompes à protons ATPase dépendantes dont le rôle est d'acidifier l'intérieur du compartiment. Ainsi, les amines protonées vont jouer un rôle de tampon qui va s'opposer à l'acidification des endosomes mais sans arrêter le fonctionnement de la pompe à protons ce qui conduit à une hypertonicité endosomale, à une entrée importante d'eau puis à la rupture de la membrane endosomale, libérant ainsi les polyplexes dans le cytosol (Boussif O et al., 1995; Kichler A et al., 2001). Le mécanisme « d'éponge à protons » a été confirmé par l'utilisation d'un inhibiteur de pompe à protons, la bafilomycine A1, qui inhibe la transfection en présence de PEI (Kichler A et al., 2001)

Cette étape d'échappement endosomal est donc déterminante pour assurer un transfert de gène efficace quelque soit le vecteur utilisé. De nombreuses études ont suggéré que seule une faible partie des lipoplexes, polyplexes ou de l'ADN après dissociation se retrouve dans le cytosol. En effet la majorité des complexes entrent par endocytose puis se retrouvent piégés dans les endosomes qui sont rapidement transportés par les microtubules vers les lysosomes où le contenu des endosomes est dégradé (Zabner J *et al.*, 1995). Les complexes doivent donc s'échapper précocément des endosomes pour permettre un transfert de gène efficace (Zelphati O and Szoka FC Jr, 1996). Néanmoins, ils doivent encore aller jusqu'au noyau pour conduire à la production de la protéine thérapeutique dans le cytoplasme.

### **2.3. Le transport cytosolique et l'entrée nucléaire**

L'ADN relargué dans le compartiment cytosolique est soit libre soit encore complexé aux vecteurs synthétiques et doit encore atteindre le noyau. La mobilité des molécules d'ADN est un facteur important pour le transport intra-cytoplasmique qui dépend de la taille et de la structure de l'ADN. En effet, des études quantitatives sur la mobilité de molécules d'ADN microinjectées dans le cytoplasme ont montré une diffusion élevée des fragments d'ADN présentant une taille inférieure à 100 pb. En revanche, lorsque la taille des fragments d'ADN augmente, la mobilité est considérablement diminuée voire pratiquement absente pour des fragments de plus de 2 Kb. Néanmoins, pour les molécules d'ADN encore complexées aux vecteurs synthétique, le cytosquelette serait impliqué dans le transport actif de l'ADN de la périphérie cellulaire vers la région péri-nucléaire grâce aux microtubules ou aux microfilaments d'actine (Godbey WT *et al.*, 1999; Suh J *et al.*, 2003).

Une fois la région péri-nucléaire atteinte, l'ADN seul ou complexé au vecteur synthétique doit pénétrer dans le noyau des cellules pour y être transcrit puis traduit en protéine thérapeutique. Cependant, le noyau est un compartiment cellulaire difficile d'accès constitué d'une double membrane interrompue par de larges structures protéiques appelées complexes du pore nucléaire. Les pores nucléaires permettent le passage passif de petites molécules de l'ordre de 40 à 60 kDa mais le passage de molécules de plus grande taille correspond à un transport actif énergie-dépendant qui nécessitent l'utilisation de séquences peptidiques particulières appelées NLS (Nuclear Localization Signal) (Görlich D and Mattaj IW, 1996). Par

conséquent, des molécules de grande taille peuvent pénétrer dans le noyau interphasique en passant à travers les pores nucléaires par un mécanisme signal-dépendant faisant intervenir des récepteurs cytosoliques d'importation nucléaire.

Les complexes vecteur synthétique/ADN pourraient néanmoins être importés dans le noyau sans passer par les pores nucléaires. En effet lors de la mitose, l'enveloppe nucléaire disparaît transitoirement. Partant de cette hypothèse, différentes études ont été réalisées et ont montré que la transfection de lipoplexes ou de polyplexes sur des cellules en phase S ou G2 améliorerait le transfert de gène (Brunner S *et al.*, 2002; Escriu V *et al.*, 2001).

### **Conclusion :**

L'étude des nombreuses étapes impliquées lors de la transfection allant de la conception des complexes vecteur synthétique/ADN à l'importation des molécules d'ADN dans le noyau, a permis de mieux comprendre la faible efficacité de transfection *in vivo* des vecteurs synthétiques. Ainsi, différents critères nécessaires au développement de nouveaux vecteurs plus efficaces pour le transfert de gène *in vitro* et plus particulièrement *in vivo* ont été déterminés. Ces nouveaux vecteurs ont été élaborés dans l'optique de cibler spécifiquement un type cellulaire donné et optimiser ainsi le potentiel de transfert de gène des vecteurs synthétiques déjà existant.

Les études physico-chimiques des complexes vecteur synthétique/ADN ont permis de montrer que ce sont généralement les complexes fortement chargés positivement qui assurent la meilleure efficacité de transfection *in vitro* en étant internalisés par une endocytose non spécifique, via les interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires chargées négativement. Cependant, ces complexes chargés positivement ne sont pas adaptés dans le cadre d'une application *in vivo* et plus particulièrement après une injection systémique. En effet, les particules chargées positivement vont interagir de manière non spécifique avec l'ensemble des membranes cellulaires chargées négativement telles que les composants du sang, les cellules endothéliales vasculaires et les tissus non ciblés. La densité de charge positive des complexes vecteur cationique/ADN limite donc leur potentiel de transfert de gène *in vivo*. Les charges positives présentes à la surface des complexes doivent donc être masquées pour éviter les interactions non spécifiques ainsi que la

reconnaissance des particules par le système immunitaire ce qui permettrait d'augmenter le temps de circulation des complexes et donc leur efficacité de transfection *in vivo*. De plus, la toxicité engendrée par l'injection des complexes vecteur cationique/ADN serait diminuée (Philipp A *et al.*, 2008).

La substitution des vecteurs synthétiques par différents ligands reconnus spécifiquement par des récepteurs membranaires présents à la surface des cellules à traiter permettrait également de supprimer l'internalisation des complexes par les cellules non ciblées et optimiser ainsi leur efficacité de transfection (Philipp A *et al.*, 2008).

Différentes stratégies ont été échaudées pour créer de nouveaux systèmes synthétiques n'interagissant pas avec les constituants des fluides biologiques, donc sans excès de charges positives, tout en étant capables de transfecter spécifiquement un type cellulaire donné. Le ciblage passif correspond à la première stratégie qui consiste à la stabilisation des formulations vecteur synthétique/ADN ainsi qu'à l'élimination des interactions non spécifiques avec l'environnement biologique afin de prolonger le temps de circulation des complexes dans la circulation sanguine et donc d'améliorer leur efficacité de transfection. La seconde stratégie est le ciblage actif qui repose sur l'interaction spécifique ligand-récepteur. Cette reconnaissance cellulaire conduit à l'internalisation des complexes par une voie d'endocytose spécifique récepteur-dépendant au niveau des cellules ciblées. Le choix du ligand est réalisé en fonction du type de cellules à transfecter et des récepteurs membranaires présents à leur surface. Les étapes limitantes comme l'échappement endosomale et l'importation nucléaire ont également été prises en compte pour développer de nouveaux vecteurs synthétiques.

### **3. Développement de nouveaux systèmes synthétiques pour un transfert de gène ciblé.**

#### **3.1. Ciblage passif**

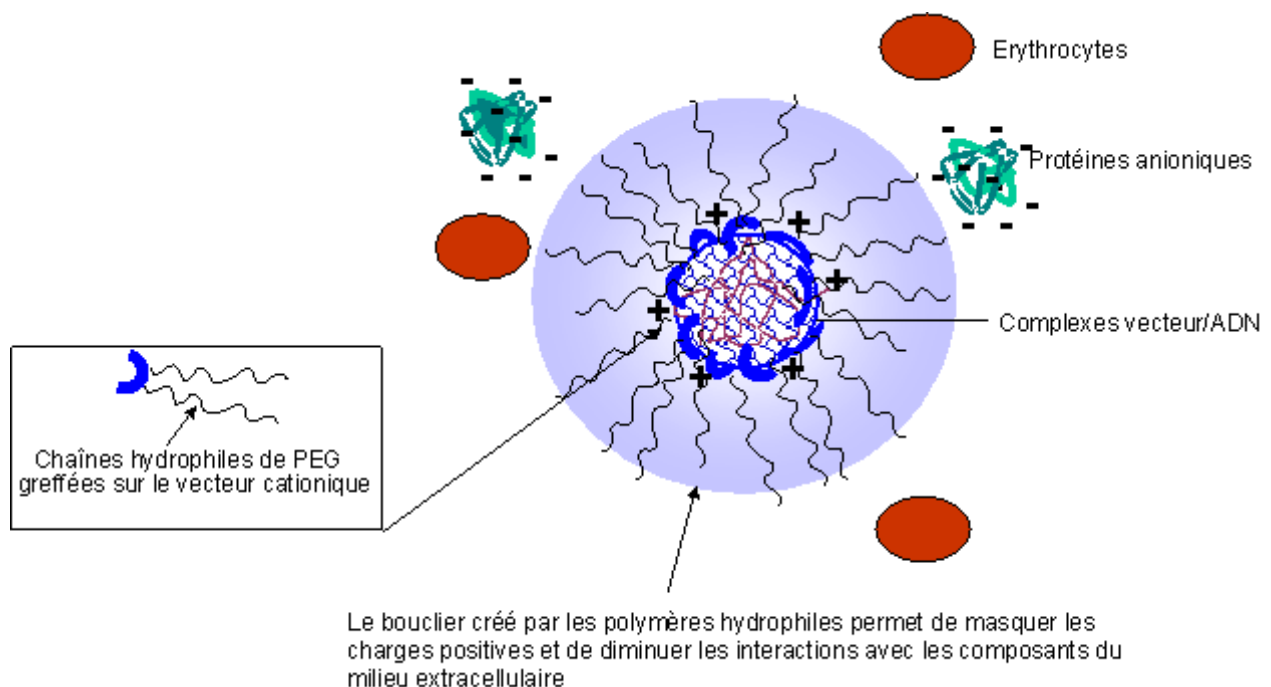
Un ADN plasmidique non protégé est très rapidement dégradé en quelques minutes par les DNases présentes dans l'espace extracellulaire. Les vecteurs synthétiques cationiques ont donc pour premier rôle, de compacter l'ADN dans des structures supramoléculaires, bloquant ainsi l'accès des nucléases aux acides nucléiques. Pour cette raison, les vecteurs synthétiques doivent être chimiquement stables contre les attaques enzymatiques ou chimiques.

La formation des lipoplexes et des polyplexes est entièrement dirigée par l'entropie du système et les interactions électrostatiques, entre les charges positives du vecteur et les charges négatives des acides nucléiques. La stabilité du complexe vecteur/ADN est donc très sensible aux divers composés chargés ainsi qu'à la concentration en sels présents dans les fluides biologiques. En effet, les interactions entre l'ADN et le vecteur sont affaiblies à de fortes concentrations salines limitant ainsi la protection de l'ADN contre la dégradation par les nucléases (Kang *et al.*, 2005). D'autre part, les complexes présentant une charge globale neutre forment en présence des sels physiologiques, des agrégats qui sont généralement inefficaces pour le transfert de gène *in vivo* (Pitard B *et al.*, 2001), pouvant même entraîner une embolie pulmonaire après une injection systémique (Morille M *et al.*, 2008). De plus, les polyplexes possédant une charge globale neutre sont peu solubles en solution aqueuse (Kabanov AV and Kabanov VA, 1995).

Les complexes chargés positivement sont certes stables colloïdalement dans les mêmes conditions mais une adsorption de protéines chargées négativement sur ces complexes chargés positivement peut entraîner une agrégation des complexes conduisant rapidement à leur prise en charge par les cellules phagocytaires (Phillip A *et al.*, 2008). En effet, des complexes chargés positivement injectés par voie intramusculaire interagissent très rapidement avec les charges négatives de la matrice extracellulaire, composée de protéoglycanes, ce qui limite leur pouvoir de diffusion et empêche les complexes d'atteindre les cellules.

Ainsi, les principales barrières limitant l'efficacité *in vivo* des complexes vecteur synthétique/ADN sont les concentrations en sels, la présence des protéines chargées négativement ainsi que leur reconnaissance par le système immunitaire.

Afin de générer des complexesfurtifs dans des fluides biologiques, différentes études ont masqué les charges positives des lipoplexes et des polyplexes en utilisant des polymères hydrophiles non immunogènes comme le poly(éthylène-glycol) (PEG) pour éviter les interactions avec les protéines chargées négativement mais également pour limiter les interactions non spécifiques avec les membranes des tissus non ciblés. Le recouvrement de la surface des complexes par les polymères hydrophiles forme un réseau hydrophile dense autour de ces particules qui crée une barrière stérique limitant ainsi toutes interactions hydrophobes ou électrostatiques avec le milieu extracellulaire (Figure 32).



**Figure 32: Effet des polymères hydrophiles sur la biodisponibilité des complexes vecteur synthétique/ADN.** Les chaînes hydrophiles de PEG s'orientent vers la périphérie du complexe et forment un bouclier, permettant de masquer les charges positives des complexes.

Ainsi les phénomènes d'adsorption ou d'adhérence des constituants sanguins sur les complexes vecteur synthétique/ADN sont diminués en présence des polymères hydrophiles permettant ainsi d'augmenter leur temps de circulation dans le sang, par rapport à des complexes dépourvus de polymères hydrophiles (Ambegia E *et al.*, 2005; Ogris M *et al.*, 1999). Ces systèmes sont essentiellement utilisés pour cibler les tissus tumoraux après injection systémique puisque possédant une charge globale neutre et étant dépourvus de ligand, ils sont incapables d'être internalisés



par interactions non spécifiques ou spécifiques par reconnaissance cellulaire au niveau d'un récepteur. Par contre, la capacité de ces systèmes à passer inaperçus au sein des fluides biologiques leur permet d'atteindre plus facilement les tumeurs par le réseau vasculaire et donc d'augmenter leur accumulation dans ces tissus. La furtivité est une condition essentielle à l'efficacité de ces systèmes mais la taille est également un paramètre à prendre en compte (Philipp A *et al.*, 2008). En effet, l'accès au tissu cible peut être restreint par la structure et la taille des capillaires sanguins en fonction de la localisation des tumeurs. Par exemple, les capillaires fenestrés limitent le passage des particules présentant un diamètre de plus de 40 nm. En revanche, les capillaires discontinus présentant un espace important entre les cellules endothéliales et la membrane basale de l'ordre de 30 à 500 nm laissent passer de larges macromolécules. Ces capillaires peuvent être rencontrés dans le foie et la rate (Nishikawa M and Huang L, 2001). Cependant, sous des conditions physiopathologiques, la structure vasculaire peut être modifiée et faciliter ainsi le passage des particules injectés et donc le ciblage tumorale. La ciblage passif nécessite donc l'utilisation de systèmes stables, non agrégés, furtifs et présentant un temps de circulation suffisamment long pour conduire à l'accumulation du système dans les tumeurs.

Les polymères hydrophiles utilisés pour modifier la charge de surface des lipoplexes et des polyplexes sont généralement des molécules de PEG ou des dérivés de PEG comme le distéaryl-phosphoéthanolamine-polyéthylène glycol (DSPE-PEG), (Morille M *et al.*, 2008; Peeters L *et al.*, 2007).

Les molécules de PEG sont introduites au niveau des lipoplexes ou des polyplexes selon deux cas de figures :

- soit ils sont greffés aux vecteurs synthétiques cationiques avant ou après complexation avec l'ADN (Ogris M *et al.*, 2003; Peeters L *et al.*, 2007).
- soit ils sont ajoutés comme stabilisateur colloïdaux au moment de la formulation des complexes vecteur/ADN (Kircheis R *et al.*, 1999; Ogris M *et al.*, 2003; Pitard B *et al.*, 2001).

L'ajout des molécules de PEG aux lipoplexes et polyplexes conduit à la formation de systèmes PEGylés appelés systèmes PEG-lipoplexes et PEG-polyplexes.

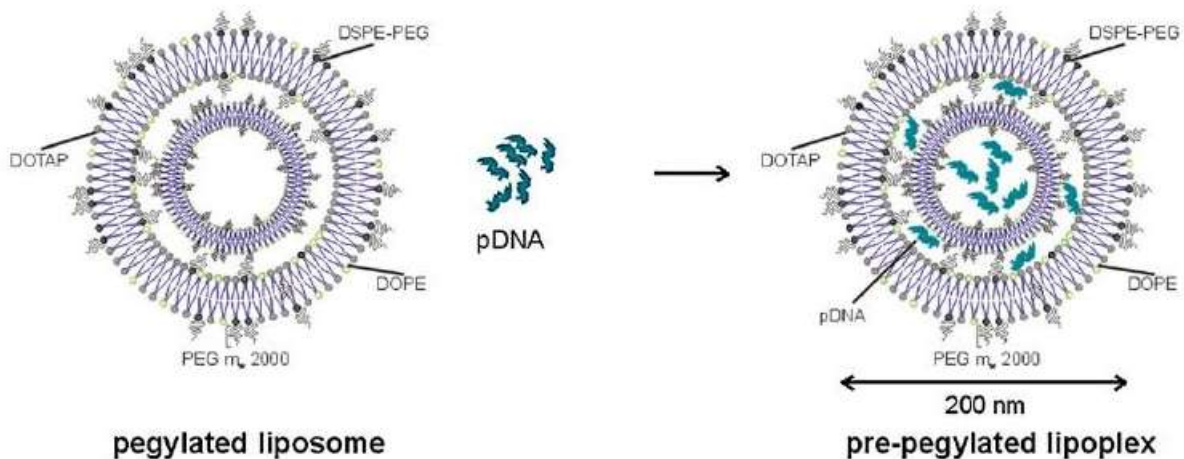
### 3.1.1. PEG-lipoplexes

Les nombreux systèmes PEG-lipoplexes développés au cours de ces dernières années ont permis de diminuer les interactions des lipoplexes avec les composants de la matrice extracellulaire ainsi que la toxicité inhérente au vecteur synthétique. Cependant, la PEGylation des lipoplexes conduit à de faibles efficacités de transfection dans différents types cellulaires (Deshpande MC *et al.*, 2004; Peeters L *et al.*, 2007; Shi F *et al.*, 2002; Song LY *et al.*, 2002). En effet, il semblerait que les chaînes de PEG réparties sur la surface des complexes lipide cationique/ADN diminuent les interactions des complexes avec les membranes cellulaires de différentes lignées cellulaires telles que des cellules cancéreuses hépatiques (HepG2) et des cellules de fibroblastes de rein de singe (Cos-7) (Deshpande MC *et al.*, 2004). En revanche, Song et al. ont montré que la PEGylation des lipoplexes n'altérait pas leur internalisation cellulaire mais inhibait par contre, leur échappement endosomal qui est une étape cruciale du processus de transfection des vecteurs non viraux (Song LY *et al.*, 2002). Ainsi, l'interaction des membranes des lipoplexes avec celles des endosomes est insuffisante pour permettre l'échappement endosomal des lipoplexes par flip-flop et donc le relargage des molécules d'ADN dans le cytoplasme. Par conséquent, la perte d'efficacité de transfection des complexes PEG-lipoplexes provient de leur difficulté à sortir des endosomes (Audouy S and Hoekstra D, 2001; Meyer O *et al.*, 1998; Shi F *et al.*, 2002; Song LY *et al.*, 2002). Certaines équipes ont donc utilisé la DOPE comme co-lipide pour favoriser l'échappement endosomal des complexes PEG-lipoplexes. L'utilisation de certains polymères hydrophiles comme le DSPE-PEG pour recouvrir la surface des lipoplexes lipide cationique/DOPE-ADN conduit à une organisation structurale stable de type lamellaire (Hyvönen Z *et al.*, 2004) qui empêche les lipoplexes de passer à une conformation en phase hexagonale inversée, nécessaire à la déstabilisation des endosomes et à la diffusion de l'ADN dans le cytosol (Koltover I *et al.*, 1998; Shi F *et al.*, 2002).

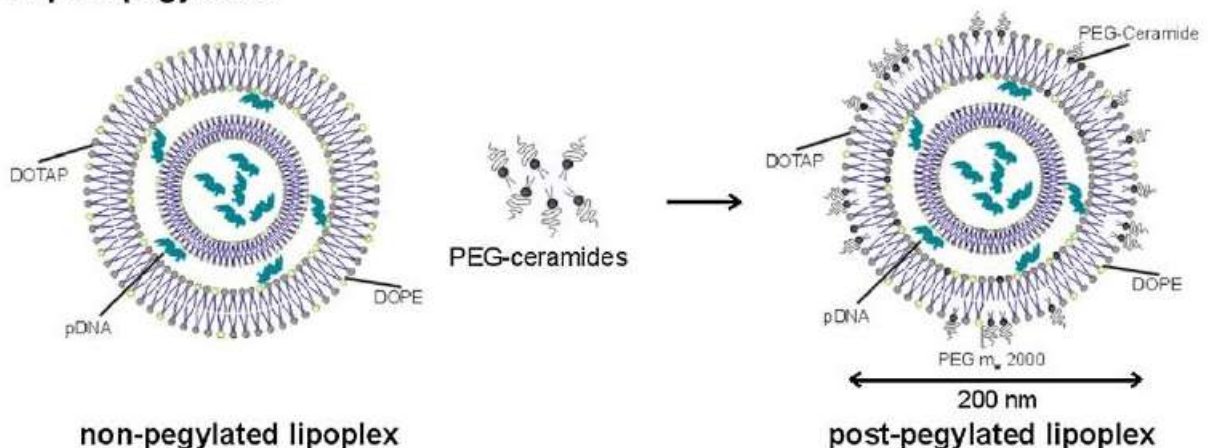
Peeters et al. ont donc comparé les méthodes d'incorporation des molécules de PEG pour étudier leur influence sur l'efficacité de transfection des systèmes PEG-lipoplexes (Peeters L *et al.*, 2007). Ces complexes PEG-lipoplexes sont constitués d'un lipide cationique classique le DOTAP, d'un co-lipide neutre la DOPE et de molécules PEGylées telles que le DSPE-PEG ou le céramide-C<sub>8</sub>-PEG (CerC<sub>8</sub>-PEG). Le CerC<sub>8</sub>-PEG est formé de PEG lié à une céramide formé d'une sphingosine et d'une chaîne d'acides gras en C<sub>8</sub>. Les molécules de DSPE-PEG ont été

préalablement liées aux liposomes DOTAP/DOPE (pré-PEGylation) avant la formation des liposomes DSPE-PEG-DOTAP/DOPE et de leur complexation avec l'ADN (Figure 33A). Quant aux molécules de CerC<sub>8</sub>-PEG, elles sont greffées aux lipoplexes après la complexation des liposomes DOTAP/DOPE avec l'ADN (post-PEGylation) (Figure 33B).

### A: pre-pegylation



### B: post-pegylation



**Figure 33: Représentation schématique des complexes PEG-lipoplexes en fonction de la méthode d'incorporation des molécules de PEG, par pré-PEGylation (A) ou par post-PEGylation (B). (d'après Peeters L et al., 2007).**

Peeters et al. confirment la faible efficacité de transfection obtenue avec des complexes constitués de DSPE-PEG. En revanche, les complexes DSPE-PEG-DOTAP/DOPE-ADN sont bien internalisés au sein des cellules transfectées. Ainsi, la présence des chaînes de PEG ne limite pas l'internalisation des complexes mais

modifie leur capacité à sortir des endosomes. Par contre la post-PEGylation des complexes DOTAP/DOPE-ADN améliore considérablement l'efficacité de transfection des complexes non PEGylés contrairement aux complexes pré-PEGylés. De plus, Shi et al. ont mis en évidence l'influence de la longueur et de la nature des molécules de PEG sur l'expression du transgène (Shi F *et al.*, 2002). En effet, les lipoplexes post-PEGylés avec des PEG-céramides composés de longues chaînes d'acides gras ainsi qu'avec du DSPE-PEG ne conduisent qu'à un faible transfert de gène (Shi F *et al.*, 2002). Il semblerait que les PEG-céramides constitués de courtes chaînes d'acides gras permettent un meilleur transfert des lipoplexes jusqu'à la membrane cellulaire ainsi qu'un meilleur échappement endosomal. Les complexes PEG-céramides-lipoplexes seraient partiellement déstabilisés au sein des vésicules endosomales donnant ainsi des lipoplexes « dé-PEGylés » capables de sortir des endosomes par le mécanisme classique d'échappement endosomal des lipides cationiques (Koltover I *et al.*, 1998; Shi F *et al.*, 2002).

Le DSPE-PEG a également été liée par d'interactions biospécifiques de type biotine-avidine après formation des complexes lipide cationique/ADN mais il ne permet pas d'obtenir une expression significative du transgène (Peeters L *et al.*, 2007; Shi F *et al.*, 2002). Ainsi le DSPE-PEG n'est pas un polymère hydrophile adapté à la conception des complexes PEG-lipoplexes car l'organisation structurale qu'il entraîne, empêche les complexes de sortir des endosomes.

Les deux méthodes d'incorporation conduisent à la formation de complexes stables, non agrégés et de petite taille de l'ordre de 100 à 200 nm mais seule la post-PEGylation assure une forte efficacité de transfection du système PEG-lipoplexes. Des complexes PEG-lipoplexes composés de DODAC (N,N-dioleyle-N,N-diméthylammonium chloride), de DOPE et de PEG-céramides greffés par post-PEGylation ne conduisent qu'à une faible efficacité de transfection (Wheeler JJ *et al.*, 1999). En effet, ces systèmes présentent une structure supramoléculaire de type lamellaire comme les PEG-lipoplexes constitués de DSPE-PEG ce qui pourrait expliquer leur faible potentiel de transfert de gène. Par conséquent, l'efficacité de ces systèmes dépend essentiellement de la nature physico-chimique des composants, de l'organisation supramoléculaire des complexes ainsi que de leur capacité à sortir des endosomes.

Les molécules de PEG peuvent également être utilisées comme stabilisateurs colloïdaux de complexes lipide cationique/ADN fortement chargés positivement pour limiter l'agrégation de ces particules à des concentrations d'ADN élevées et permettre ainsi leur utilisation *in vivo* (Pitard B et al., 2001). En effet, à de fortes concentrations d'ADN, les complexes lipide cationique/ADN sont instables colloïdalement et forment de larges agrégats même à des rapports de charge +/- élevés, ce qui limite leur utilisation *in vivo*. Pitard et al. ont donc étudié le potentiel de différents dérivés de PEG pour stabiliser colloïdalement les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés à un rapport de charge de 6 ainsi qu'à une concentration d'ADN de 0,25 mg/mL (Pitard B et al., 2001). L'ajout des dérivés de PEG à différents rapports (w/w) PEG/ADN conduit rapidement à la stabilisation colloïdale des lipoplexes chargés positivement et ce dès un faible rapport (w/w) pour les dérivés présentant une longue chaîne de PEG comme le Chol-PEG (cholestérol-poly(éthylène glycol)100). Après injection intranasale, les complexes stabilisés colloïdalement améliorent considérablement l'expression du transgène dans les poumons par rapport à celle obtenue avec les lipoplexes non stabilisés. Par conséquent la stabilisation colloïdale des lipoplexes permet d'augmenter leur efficacité de transfection *in vivo* pour de fortes concentrations d'ADN. La présence des molécules de PEG à la surface des lipoplexes semblent empêcher leur internalisation cellulaire en limitant les interactions avec les membranes cellulaires (Hong K et al., 1997; Wheeler JJ et al., 1999). Ainsi, leur efficacité *in vivo* pourrait être expliquée par une dissociation rapide des complexes après leur administration (Wheeler JJ et al., 1999). Néanmoins ces complexes présentent une charge globale positive qui limite leur utilisation par injection systémique à cause des possibles interactions non spécifiques avec les constituants des fluides biologiques.

Par conséquent, la plupart des complexes PEG-lipoplexes formés après incorporation des molécules de PEG par pré ou post-PEGylation ou encore en tant que stabilisateurs colloïdaux ne permettent pas de masquer totalement les charges positives des lipoplexes qui présentent encore un potentiel zéta positif et peuvent donc encore interagir avec les protéines de surface ou circulantes chargées négativement après injection systémique (Peeters L et al., 2007).

### 3.1.2. PEG-polyplexes

De nombreux systèmes PEG-polyplexes ont également été synthétisés dans le but de diminuer la toxicité des polyplexes et d'augmenter leur temps de circulation dans le sang (Lee M and Kim SW, 2005; Lungwitz U *et al.*, 2005; Morille M *et al.*, 2008; Nimesh S *et al.*, 2006). La plupart des complexes PEG-polyplexes qui ont été développés sont constitués de polymères cationiques tels que le PEI ou la PLL. Les molécules de PEG ont été greffées aux polymères cationiques soit par pré-PEGylation soit par post-PEGylation comme dans le cas des PEG-lipoplexes (Lee M and Kim SW, 2005; Lungwitz U *et al.*, 2005).

Les molécules de PEG modifient les caractéristiques physico-chimiques des complexes polymère cationique/ADN. En effet, les complexes PEG-polyplexes présentent une taille supérieure à celle des polyplexes non PEGylés de l'ordre de 100 nm de diamètre. La charge de surface des complexes est également diminuée ce qui conduit à une meilleure solubilité ainsi qu'à une plus faible toxicité des polyplexes. De plus après une injection systémique, ils présentent un temps de circulation dans le sang plus long que l'ADN nu ou les polyplexes non PEGylés grâce à la diminution de la densité de charge de surface des polyplexes, évitant ainsi les interactions non spécifiques avec les protéines circulantes ou de surface (Lee M and Kim SW, 2005). Le recouvrement des polyplexes par des molécules de PEG a donc permis d'augmenter leur efficacité de transfection *in vivo* au sein des tissus tumoraux. Cependant la nature des composés constituant les complexes PEG-polyplexes peuvent modifier la stabilité des particules et donc leur potentiel de transfert de gène.

Par exemple, différentes études ont étudié l'influence du pourcentage de molécules de PEG greffé à la PLL sur la stabilité et la complexation de l'ADN au sein des polyplexes PEG-PLL (Lee M *et al.* 2001 ; Toncheva V *et al.* 1998). Les complexes PEG-PLL constitués de plus de 10 %mol de PEG sont partiellement dégradés par les DNases et conduisent à une faible expression du transgène (Lee M *et al.* 2001). Par conséquent, les molécules de PEG influencent la complexation de l'ADN avec les polymères cationiques en diminuant les interactions électrostatiques nécessaires à une bonne compaction de l'ADN. En effet, les molécules de PEG sont greffées au niveau des fonctions amines primaires des polymères cationiques qui servent essentiellement à la complexation de l'ADN lors de la formation des complexes

polymère cationique/ADN. Ainsi, plus le taux de greffage des molécules de PEG augmente plus le nombre de fonctions amines primaires disponibles pour interagir avec l'ADN diminue, modifiant ainsi l'état de compaction des molécules d'ADN au sein des particules. Ces particules sont donc moins stables et l'ADN peut être plus facilement dégradé par les nucléases.

Les mêmes résultats ont été obtenus avec les polyplexes PEG-PEI. En effet, le pourcentage de PEGylation ainsi que le poids moléculaires des molécules de PEG greffées sur le PEI influencent fortement les propriétés des complexes PEG-PEI comme la condensation de l'ADN et leur efficacité de transfection (Petersen H *et al.*, 2002; Wolfert MA *et al.*, 1999).

Par conséquent, différentes équipes ont d'abord condensé l'ADN avec les polymères cationiques avant de greffer les molécules de PEG. Cette stratégie de post-PEGylation a conduit à une meilleure condensation de l'ADN ainsi qu'à une meilleure efficacité de transfection par rapport à la pré-PEGylation (Kircheis R *et al.*, 1999; Lungwitz U *et al.*, 2005; Ogris M *et al.*, 1999).

D'autres types de PEG peuvent être utilisés pour masquer l'excès de charges positives des polyplexes, comme les copolymères à blocs amphiphiles de type poloxamères ( $OE_x-OP_y-OE_x$ ) (cf § 1.2.3.1). Par exemple, les polymères P85 et P123 ont été greffés par liaison covalente au PEI (2KDa) et forment avec l'ADN des complexes stables de 110 nm de diamètre (Nguyen HK *et al.*, 2000; Ochietti B *et al.*, 2002). 24h après injection en systémique, ces complexes conduisent à une expression du transgène dans la rate, les poumons, le cœur et le foie, qui est similaire voire supérieure à celle obtenue avec les lipides cationiques commerciaux (Lipofectin<sup>®</sup>, Lipofectamine<sup>™</sup>, et CELLfectin<sup>®</sup>). De plus, les complexes copolymères à blocs-PEI-ADN n'induisent qu'une faible toxicité, puisque seule une petite partie des complexes a été retrouvée dans les lymphocytes (Nguyen HK *et al.*, 2000; Ochietti B *et al.*, 2002). La forte stabilité de ces particules est due à la présence des copolymères à blocs qui masquent les charges positives du PEI complexé à l'ADN pour conduire à une charge de surface proche de zéro. Les copolymères à blocs forment également une couronne d'OE à la surface des complexes qui assurent ainsi leur stabilité stérique dans les fluides biologiques. De plus, les OP des copolymères à blocs interagissent avec les membranes lipidiques cellulaires facilitant ainsi l'entrée des complexes dans les cellules. Par conséquent, ces complexes copolymères à

blocs-polyplexes présentent de nombreux avantages en terme de stabilité et d'efficacité de transfection par rapport aux complexes PEG-polyplexes (Nguyen HK *et al.*, 2000; Ochietti B *et al.*, 2002).

La présence des molécules de PEG à la surface des lipoplexes et des polyplexes permet d'augmenter le temps de circulation des complexes dans le sang, leur laissant ainsi plus de temps pour atteindre les tumeurs. Cependant, les molécules de PEG limitent l'internalisation des complexes dans les cellules ainsi que leur échappement endosomal dans le cas des lipoplexes. En effet, la charge globale de surface des complexes est suffisamment diminuée pour limiter les interactions électrostatiques avec les composés biologiques mais également avec les membranes des cellules à traiter limitant ainsi leur efficacité de transfection. Cependant, les charges positives ne sont pas non plus complètement masquées, ce qui induit une transfection des cellules non ciblées par interactions non spécifiques avec les membranes cellulaires chargées négativement. Ainsi, ces complexes ne sont pas adaptés pour cibler spécifiquement un type cellulaire donné.

Différentes stratégies ont été élaborées pour améliorer l'efficacité de transfert de gène des complexes PEG-lipoplexes et PEG-polyplexes. Par exemple, un bras espaceur pH-sensible a été greffé entre les molécules de PEG et le vecteur synthétique cationique pour améliorer l'échappement endosomal (Choi JS *et al.*, 2003; Greenfield RS *et al.*, 1990; Walker GF *et al.*, 2005). Le greffage d'un ligand aux extrémités des molécules de PEG en fonction des cellules à cibler et du récepteur membranaire présent à leurs surfaces a également été réalisé pour éviter les interactions non spécifiques et assurer ainsi un ciblage actif de ces complexes *in vivo* via une reconnaissance spécifique ligand-récepteur (Moffatt S *et al.*, 2005; Ogris M *et al.*, 2003; Xu L *et al.*, 2002).

### **3.2. Ciblage actif**

Le ciblage actif consiste à incorporer un motif de ciblage sur des vecteurs synthétiques qui vont alors être reconnus de manière spécifique par un récepteur exprimé à la surface des cellules cibles dans le but d'améliorer l'internalisation des complexes vecteur/ADN par endocytose récepteur-dépendant. Différents aspects doivent être pris en compte dans le choix du motif de ciblage. Par exemple, certains



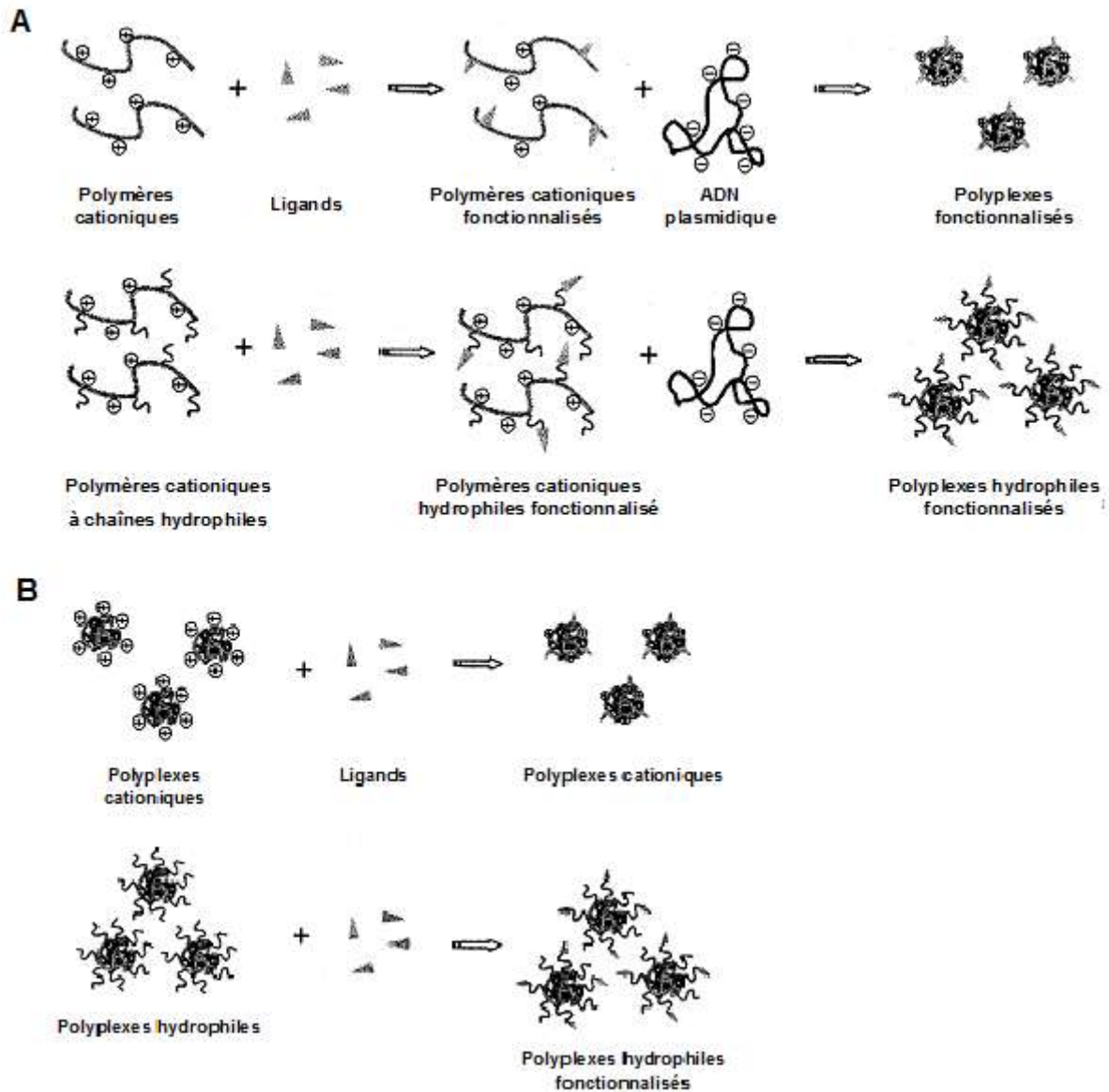
ligands sont tissu spécifique comme les asialoglycoprotéines reconnues exclusivement par le récepteur présent à la surface des hépatocytes (Choi YH *et al.*, 1998), d'autres tels que la transferrine ou le folate peuvent être internalisés par des récepteurs exprimés à la surface de nombreuses cellules (Wagner E *et al.*, 1998; Wu J *et al.*, 2006). De plus, certains ligands peuvent porter des charges positives et interagir de manière non spécifique avec les membranes cellulaires chargées négativement comme le facteur de croissance FGF (Fibroblast Growth Factor) (Maruta F *et al.*, 2002). Des ligands entièrement synthétiques peuvent être également utilisés pour délivrer spécifiquement des acides nucléiques comme des anticorps anti-récepteur, des fragments d'anticorps ainsi que des peptides (Philipp A *et al.*, 2008). Par conséquent, le choix du ligand est très important pour un transfert de gène efficace. Ainsi, de très nombreux vecteurs synthétiques cationiques ont été couplés à différents ligands afin de cibler un tissu ou un type cellulaire donné *in vitro* et *in vivo* (Tableau 3).

Structure ciblée	Ligand	Cellules cibles	Références
Récepteur aux asialoglycoprotéines	galactose, lactose, asialooromucoïde	cellules hépatiques	Sagara K <i>et al.</i> , 2002; Bettinger T <i>et al.</i> , 1999; Zanta MA <i>et al.</i> , 1997; Choi YH <i>et al.</i> , 1998; Wu GY <i>et al.</i> , 1987;
Récepteur au galactose	galactose, lactose	cellules épithéliales pulmonaires	Grosse S <i>et al.</i> , 2004;
Récepteur au mannose	mannose	cellules dendritiques	Diebold SS <i>et al.</i> , 1999; Avrameas A <i>et al.</i> , 1996
Récepteur à la transferrine	transferrine	cellules tumorales	Kursa M <i>et al.</i> , 2003; Ogris M <i>et al.</i> , 1999; Kircheis R <i>et al.</i> , 2001
Récepteur au folate	acide folique	cellules tumorales	Lu Y <i>et al.</i> , 2002; Guo W <i>et al.</i> , 2001; Bennis JM <i>et al.</i> , 2002
Intégrines	RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique)	cellules endothéliales tumorales	Kunath K <i>et al.</i> , 2003; Woodle MC <i>et al.</i> , 2001; Erbacher P <i>et al.</i> , 1999
Récepteur EGF	EGF (Epithelial Growth Factor)	cellules tumorales	Blessing T <i>et al.</i> , 2001; Kircheis R <i>et al.</i> , 2001; Ogris M <i>et al.</i> , 2003

**Tableau 3: Exemple de différents ligands classiquement utilisés pour le transfert de gène ciblé.**

Les ligands sont généralement greffés par voie chimique sur les vecteurs synthétiques cationiques comme les lipides ou les polymères cationiques, selon différentes stratégies. Le motif de ciblage est greffé avant ou après la complexation avec les acides nucléiques, soit directement sur le vecteur synthétique soit sur les

chaînes hydrophiles comme les molécules de PEG déjà liées au vecteur (Kang HC *et al.*, 2005) (Figure 34).



**Figure 34: Fixation du ligand avant (A) ou après (B) la formation des complexes vecteur synthétique/ADN (d'après Kang HC *et al.*, 2005).**

La seconde stratégie permet de fixer le ligand par un mécanisme d'interactions biospécifiques de type biotine-avidine à la place de la conjugaison chimique. De plus, le greffage des motifs de ciblage après formation des complexes vecteur/ADN permet de maximiser le nombre de ligands présents à la surface des complexes et d'augmenter ainsi la biodisponibilité des ligands lors de la reconnaissance cellulaire ligand-récepteur (Kang HC *et al.*, 2005). Cependant dans les deux cas, les

molécules de PEG servent de bras espaceur et permettent d'améliorer l'accessibilité des complexes au récepteur ciblé en facilitant leur fixation.

### **3.2.1. Transfert de gène ciblé dans les tumeurs**

Les cellules tumorales expriment de nombreux récepteurs à leurs surfaces. Par exemple la transferrine (Tf) qui est une glycoprotéine sérique généralement internalisée dans les érythrocytes ainsi que dans les cellules prolifératives comme les cellules cancéreuses, est un ligand couramment utilisé pour cibler spécifiquement les cellules tumorales (Kircheis R *et al.*, 2001b; Mao HQ *et al.*, 2001). Il a été montré que le greffage de la transferrine par amination réductrice sur des polyplexes PEI/ADN permettait d'améliorer l'internalisation cellulaire des complexes Tf-PEI/ADN par endocytose récepteur-dépendant (Kircheis R *et al.*, 1997; Kircheis R *et al.*, 2001b). De plus, ces complexes délivrés par voie systémique parviennent à atteindre les tissus tumoraux et conduisent à une bonne efficacité de transfection *in vivo* et ce même pour de faibles rapports de charge +/- (Kircheis R *et al.*, 1999; Kircheis R *et al.*, 2001b; Kursá M *et al.*, 2003; Ogris M *et al.*, 1999; Ogris M *et al.*, 2003; Smrekar B *et al.*, 2003). A des taux d'incorporation élevés, la transferrine assure non seulement une fonction de ciblage mais également une fonction de protection des polyplexes en diminuant leur densité de charge et donc en limitant les interactions avec les constituants des fluides biologiques (Kircheis R *et al.*, 2001b).

Les systèmes les plus efficaces pour le transfert de gène ciblé dans les tumeurs correspondent à des particules formées après complexation de l'ADN aux polymères cationiques PEI ou PEG-PEI fonctionnalisés par des motifs transferrine. De plus, l'expression du transgène est significativement améliorée par rapport à des systèmes équivalents dérivés de PEI branché (Kursá M *et al.*, 2003; Ogris M *et al.*, 2003). L'activité du transgène varie selon le type de cellules tumorales transfectées mais aussi en fonction de la vascularisation des tumeurs, de l'apparition de tissu nécrotique et de l'infiltration par les macrophages (Smrekar B *et al.*, 2003). En effet, une partie des polyplexes est internalisée dans les macrophages ce qui conduit à une forte dégradation de l'ADN dans les cellules de Kupffer présentes dans le foie (Kircheis R *et al.*, 2001b). Cependant, la plus forte expression du transgène est située dans les tissus tumoraux ainsi qu'au niveau du site de l'injection (Hildebrandt IJ *et al.*, 2003).

Le récepteur du facteur de croissance de l'épithélium (EGF, Epidermal Growth Factor) étant largement surexprimé dans de nombreuses cellules tumorales (Kim H and Muller WJ, 1999), il constitue également une cible de choix pour le transfert de gène dans le tissu tumoral. Par conséquent différentes équipes ont greffé l'EGF sur plusieurs vecteurs synthétiques cationiques comme le PEI en tant que motif de ciblage. En effet, les complexes EGF-PEI/ADN sont internalisés par endocytose récepteur-dépendant au sein des cellules tumorales améliorant ainsi l'efficacité de transfection des polyplexes PEI/ADN (Blessing T *et al.*, 2001; Kircheis R *et al.*, 2001a). L'EGF a été incorporé soit directement sur le PEI soit aux extrémités distales des molécules de PEG par pré ou post-PEGylation des polyplexes PEG-PEI/ADN. Les deux types de complexes EGF-PEI/ADN et EGF-PEG-PEI/ADN conduisent à une efficacité de transfection *in vitro* 10 à 100 fois supérieure par rapport à celle obtenue avec les polyplexes non substitués ce qui semble suggérer que la présence d'un bras espaceur n'interfère que légèrement au niveau de la fixation de l'EGF à son récepteur (Blessing T *et al.*, 2001). De plus après injection systémique des complexes EGF-PEG-PEI/ADN, le transgène est bien détecté dans le tissu tumoral même si son niveau d'expression varie au sein des différentes tumeurs portées par le même animal. Par conséquent, les motifs EGF présents à la surface des complexes vecteur/ADN permettent d'améliorer l'efficacité de transfection des complexes non substitués en assurant une meilleure internalisation par ciblage du récepteur à l'EGF (Smrekar B *et al.*, 2003).

Le folate qui correspond à la forme anionique de l'acide folique, vitamine nécessaire à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques, a également été greffé sur différents systèmes de transfert de gène dans le but de cibler les tissus cancéreux (Lu Y and Low PS, 2002). Le récepteur au folate est fortement surexprimé à la surface de nombreuses cellules cancéreuses permettant ainsi une meilleure internalisation des complexes via une reconnaissance cellulaire ligand-récepteur (Lungwitz U *et al.*, 2005). En effet, les polyplexes folate-PEG-PEI/ADN et folate-PEG-PLL/ADN présentent une efficacité de transfection supérieure à celle obtenue avec les polymères cationiques non substitués (Guo W *et al.*, 1999; Mislick KA *et al.*, 1995). De plus, comme pour les autres polyplexes, la présence du PEG permet d'améliorer l'efficacité de transfection des complexes folate-vecteur/ADN en limitant

les interactions non spécifiques avec les constituants biologiques (Ward CM *et al.*, 2002) ainsi qu'en assurant une certaine activité endosomolytique.

Le peptide RGD (Arginine-Glycine-acide Aspartique) est également un ligand couramment greffé aux systèmes de transfert de gène pour cibler un récepteur transmembranaire appartenant à la famille des intégrines dont l'expression est amplifiée à la surface des cellules endothéliales tumorales. En effet, plusieurs intégrines reconnaissent le peptide RGD qui constitue généralement les protéines du sérum ou celles de la matrice extracellulaire ce qui permet ainsi de médier leur internalisation au sein des cellules (Lungwitz U *et al.*, 2005; Panetti TS *et al.*, 1995). Par conséquent différents peptides RGD de type RGDC (Kunath K *et al.*, 2003) et CYGGRGDTP (Erbacher P *et al.*, 1999b) ont été greffés au PEI. La présence du ligand améliore significativement l'expression du transgène au sein des cellules cancéreuses par rapport à celle obtenue avec les complexes non substitués PEI/ADN grâce à la reconnaissance spécifique ligand-récepteur. Les complexes RGD-PEI/ADN sont bien internalisés par endocytose spécifique puisque l'efficacité de transfection des complexes est perdue lorsque l'acide aspartique est remplacé dans la séquence peptidique par de l'acide glutamique confirmant ainsi le rôle des intégrines dans l'internalisation cellulaire des complexes (Erbacher P *et al.*, 1999b). De plus, le potentiel de transfert de gène des complexes RGD-PEI/ADN augmente avec le nombre de résidus RDG présents à la surface des complexes (Lungwitz U *et al.*, 2005).

D'autre part pour diminuer la densité de charge de ces complexes tout en conservant leur effet de ciblage, des peptides RGD comme RGDC (Kunath K *et al.*, 2003) et ACRGDMFGCA (Woodle MC *et al.*, 2001) ont été liés aux extrémités distales de chaînes de PEG déjà greffées au PEI. Même si les complexes ACRGDMFGCA-PEG-PEI/ADN présentent une meilleure efficacité de transfection que les polyplexes PEI/ADN, le système RGDC-PEG-PEI/ADN délivre moins d'ADN que les particules dépourvues de motifs de ciblage. Par conséquent, les molécules de PEG semblent dans ce cas modifier la reconnaissance cellulaire du peptide par le récepteur. Ainsi dans le cadre du ciblage du récepteur aux intégrines, l'utilisation des molécules de PEG dans les systèmes fonctionnalisés par des peptides RGD est encore largement controversée (Kunath K *et al.*, 2003).

### **3.2.2. Transfert de gène ciblé dans les cellules épithéliales pulmonaires**

Différents vecteurs synthétiques cationiques tels que la PLL et le PEI ont été substitués par des résidus glycosidiques comme le lactose ou le mannose qui sont reconnus spécifiquement par des récepteurs membranaires de type lectines présents à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Grosse S *et al.*, 2004; Klink DT *et al.*, 2001; Kollen WJ *et al.*, 1999a; Kollen WJ *et al.*, 1999b; Midoux P *et al.*, 1993; Monsigny M *et al.*, 1998). Les lectines endogènes des cellules épithéliales pulmonaires ont été très peu décrites contrairement aux autres lectines présentes à la surface des cellules animales (Kollen WJ *et al.*, 1996). La principale lectine membranaire exprimée à la surface des cellules épithéliales des voies aériennes reconnaît spécifiquement les résidus mannosyles. Cependant, les complexes vecteur/ADN présentant des motifs mannose à leur surface conduisent à une faible efficacité de transfection bien qu'ils jouent un rôle important dans le trafic intracellulaire grâce à la présence de lectines nucléocytoplasmiques (Grosse S *et al.*, 2002). Par contre, bien que la lectine membranaire reconnaissant les résidus lactosyles est faiblement exprimée par les cellules épithéliales pulmonaires, les complexes vecteur/ADN lactosylés sont les plus efficaces pour transférer *in vitro* les cellules épithéliales primaires des voies aériennes (Fajac I *et al.*, 1999; Klink DT *et al.*, 2001) ainsi que les cellules de la trachée (Allo JC *et al.*, 2000). Kollen WJ *et al.*, ont également montré que l'efficacité de transfection des complexes vecteur/ADN dépendait des résidus glycosyles greffés aux vecteurs synthétiques (Kollen WJ *et al.*, 1996). Les vecteurs présentant un résidu galactosyle lié par une liaison anomère de configuration  $\beta$  conduisent à la même expression du transgène dans les cellules épithéliales des voies aériennes que les vecteurs portant des résidus lactosyles mais inférieure à celle obtenue avec les vecteurs fonctionnalisés par des résidus mannosyles. De plus, les cellules épithéliales alvéolaires de type I présentent à leur surface une lectine présentant une forte affinité pour les glycoprotéines portant des motifs galactose terminaux (Bies C *et al.*, 2004).

Par conséquent, le galactose et le lactose semble être des ligands prometteurs pour cibler spécifiquement les poumons. En effet, il a été démontré que l'ajout d'une concentration de lactose libre à 0,1M dans le milieu de transfection permettait d'inhiber la fixation d'albumine de sérum bovin lactosylée aux cellules épithéliales pulmonaires (Klink DT *et al.*, 2001). Ainsi, différents systèmes de vectorisation ont été mis au point pour le transfert de gène spécifique dans le tissu pulmonaire en

greffant des résidus lactosyles sur les vecteurs synthétiques utilisés. La glycosylation est un processus simple où le degré de substitution peut être facilement déterminé. Dans le cas de la PLL, 40% des fonctions amines sont liées à un résidu lactosyle conférant ainsi à la PLL lactosylée (Lac-PLL) la capacité d'être reconnue de façon efficace par les récepteurs au lactose présents à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Kollen WJ *et al.*, 1999b). Le greffage d'unités lactose sur la PLL permet également de diminuer l'immunogénicité ainsi que la toxicité inhérente du vecteur (Di Stefano G *et al.*, 1995; Kollen WJ *et al.*, 1999b). Ainsi, la Lac-PLL complexée à de l'ADN plasmidique conduit à une plus forte expression du transgène au sein des cellules épithéliales pulmonaires que celle obtenue avec la PLL non substituée ou avec d'autres PLL glycosylées (Klink DT *et al.*, 2001). Cependant, la PLL présente un nombre insuffisant de groupements amines pour assurer un échappement endosomal efficace des polyplexes PLL/ADN ce qui nécessite donc l'ajout d'agents endosomolytiques pour améliorer le potentiel de transfert de gène de ces complexes (Merdan T *et al.*, 2002; Morille M *et al.*, 2008). En effet, la combinaison d'agents endosomolytiques tels que la chloroquine et les peptides fusogènes conduisent à une nette augmentation de l'expression du gène rapporteur obtenu après transfection des polyplexes Lac-PLL/ADN (Kollen WJ *et al.*, 1999b). De plus, la Lac-PLL permet de transférer un plus grand nombre de cellules épithéliales pulmonaires puisque la protéine produite à partir du gène rapporteur est détectée dans 90% des cellules. Par contre, la présence d'agents endosomolytiques rend difficile l'utilisation de la Lac-PLL *in vivo*.

Pour améliorer l'étape d'échappement endosomal, un autre polymère cationique a été utilisé le PEI, qui permet aux complexes vecteur/ADN de sortir des vésicules endosomales sans l'adjonction d'agents endosomolytiques dans le milieu de transfection, contrairement aux PLL. Un PEI branché de 25 kDa a été substitué par différents résidus glycosidiques dont l'efficacité de transfection a été évaluée *in vitro* dans des cellules épithéliales des voies aériennes humaines immortalisées ou en culture primaire (Fajac I *et al.*, 2003; Grosse S *et al.*, 2004). Parmi les différents résidus glycosidiques testés, le lactose est le ligand qui permet la meilleure internalisation des complexes PEI/ADN ce qui confirme les résultats précédemment obtenus avec la Lac-PLL. Les complexes Lac-PEI/ADN sont non seulement les plus efficaces pour le transfert de gène dans les cellules épithéliales pulmonaires immortalisées mais ils conduisent également à une plus forte expression du

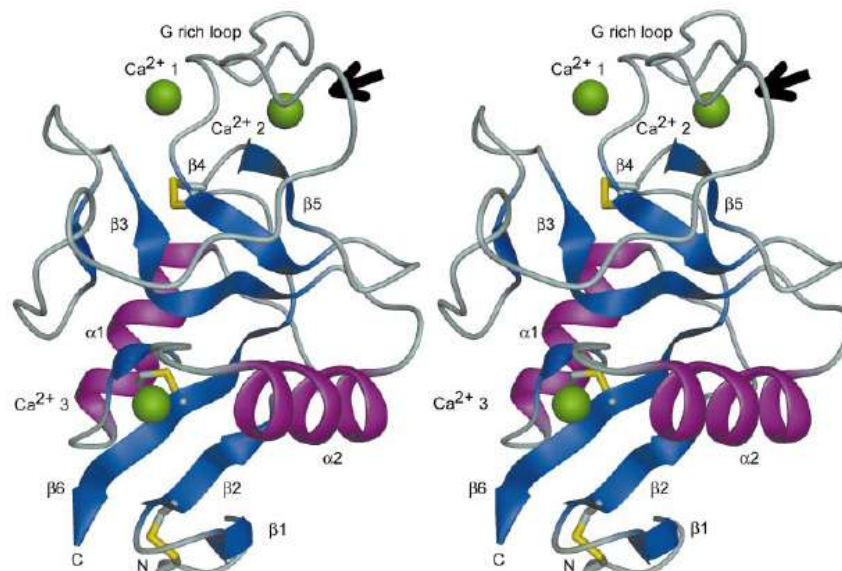
transgène ainsi qu'à un plus grand nombre de cellules transfectées par rapport aux complexes PEI/ADN non lactosylés. De plus, les complexes Lac-PEI/ADN sont les seuls à assurer un transfert de gène efficace dans les cellules épithéliales pulmonaires primaires (Grosse S *et al.*, 2004). Par conséquent, la forte efficacité de transfection obtenue avec le Lac-PEI est due à une meilleure internalisation des complexes au sein des cellules grâce aux résidus lactose qui permettent un meilleur ciblage cellulaire par rapports aux autres ligands greffés au PEI. Par contre, bien que les motifs de ciblage permettent d'internaliser une partie des complexes Lac-PEI/ADN par endocytose clathrine-dépendante, les complexes restent encore chargés positivement de par la présence des charges positives apportées par les fonctions amines non substituées du PEI entraînant donc une internalisation non spécifique des complexes par interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires. De plus, les complexes PEI/ADN conduisent *in vivo* après injection intratrachéale à une forte inflammation du tissu pulmonaire (Desigaux L *et al.*, 2005). Ainsi, malgré une toxicité cellulaire diminuée, le Lac-PEI ne semble pas être un vecteur synthétique adapté pour le transfert de gène ciblé dans les poumons. Par contre, le lactose reste un ligand prometteur pour cibler spécifiquement *in vivo* les cellules épithéliales des voies aériennes.

### **3.2.3. Transfert de gène ciblé dans les cellules hépatiques**

Le récepteur aux asialoglycoprotéines (ASPGR) qui est abondamment exprimé à la surface des cellules hépatiques, est un des récepteurs glycosylés les plus utilisés pour concevoir des systèmes de transfert de gène capables de cibler un type cellulaire donné qui correspond ici aux hépatocytes (Schwartz AL, 1984). Ce récepteur est localisé majoritairement à la surface basolatérale des hépatocytes qui est en contact avec la circulation sanguine. Selon les espèces, il est composé de deux à trois sous-unités qui correspondent à des lectines transmembranaires de type C d'environ 300 acides aminés (AA). Elles sont composées d'un court domaine -NH<sub>2</sub> terminal cytoplasmique (40AA), d'un signal d'ancrage membranaire interne (20AA) et d'une extrémité -COOH extracellulaire (230AA) qui contient le domaine de reconnaissance des résidus saccharidiques (« Carbohydrate Recognition Domain » ou CRD de 150AA). Par exemple, le ASPGR exprimé à la surface des hépatocytes humains est composé de deux sous-unités (HH1 et HH2) associées en tétramères, pour que le récepteur soit fonctionnel sous la forme d'homodimères ou



d'hétérodimères. La sous-unité majoritaire (HH1, 41kDa) est 7 fois plus abondante que la sous-unité mineure (HH2, 50kDa). Par contre, le récepteur fonctionnel des hépatocytes de rat est constitué de trois sous-unités, RHL-1 (41,5kDa), RHL-2 (49kDa) et RHL-3 (54kDa) complexées sous la forme d'un hexamère. La sous-unité majeure correspond à RHL-1 qui représente 70 à 80% de la masse totale de récepteur. Les sous-unités RHL-2 et RHL-3 présentent une structure similaire ne variant que par la présence de structures carbonées différentes. Le nombre de ASPGR à la surface des cellules hépatiques varie en fonction des espèces ainsi qu'en fonction de l'origine des cellules. En effet, les hépatocytes primaires de rat fraîchement isolés expriment 500 000 récepteurs par cellule (Schwartz AL *et al.*, 1980) alors que le nombre de ASPGR présents à la surface d'hépatocytes humains issus de lignées cellulaires tels que les cellules HepG2 est de 150 000 par cellule (Schwartz AL *et al.*, 1981). En revanche, les acides aminés constituant le ASPGR ainsi que le ligand naturel se fixant sur le CRD sont similaires aux deux espèces (Ashwell G and Harford J, 1982). Le ligand naturel du ASPGR correspond à des glycoprotéines désialylées portant un résidu galactose ou N-galactosamine (GalNac) terminal qui se fixe au CRD du récepteur par une liaison calcium dépendante (Figure 35) (Drickamer K and Taylor ME, 1993; Meier M *et al.*, 2000).



**Figure 35: Cristallographie du domaine CRD de la sous-unité H1.** Les deux hélices  $\alpha$  sont présentées en magenta, les feuillets  $\beta$  en bleu, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  fixés à la boucle riche en glycine en vert et les trois ponts dissulfures en jaune. Les domaines N et C terminaux se situent en bas de l'image (d'après Meier M *et al.*, 2000).

De plus, les glycoprotéines portant un résidu galactosyle terminal lié par une liaison anomère de configuration  $\beta$  présentent une meilleure affinité pour le ASPGR, comme ce qui est le cas en général pour les lectines de type C (Drickamer K and Taylor ME, 1993). Une fois fixées sur le récepteur, ces glycoprotéines sont internalisées au sein des hépatocytes par endocytose clathrine-dépendante (Lungwitz U *et al.*, 2005; Pricer WE and Ashwell G, 1971). Les complexes ligand-récepteur se dissocient ensuite dans les endosomes. Puis après échappement endosomal, le ligand est transporté dans les lysosomes pour y être dégradé alors que le récepteur est recyclé à la surface de la cellule (Ashwell G and Harford J, 1982). Des études ont montré qu'un ASPGR peut être endocyté, libéré des vésicules endosomales puis recyclé à la surface des cellules hépatiques en 8 min (Schwartz AL, 1984). Le temps de demi-vie du ASPGR a également été évalué *in vivo* et *in vitro* sur des cellules en culture et correspond respectivement à 88 et 20H.

Le ASPGR est un des récepteurs glycosylés les plus étudiés et décrits dans la littérature. En effet, le foie est un organe important qui est à l'origine de nombreuses maladies génétiques métaboliques comme l'hypercholestérolémie familiale, les maladies autosomales liées à une déficience en récepteurs LDL (lipoprotéines de faible densité) mais aussi les hémophilies A et B qui sont dues à un déficit de production des facteurs de coagulation VII et IX (Lungwitz U *et al.*, 2005). Par conséquent, le traitement de ces pathologies par thérapie génique représente aujourd'hui un enjeu majeur. De nombreux ligands mono ou polysaccharidiques présentant une certaine affinité pour le ASPGR comme le galactose (Bettinger T *et al.*, 1999; Morimoto K *et al.*, 2003; Sagara K and Kim SW, 2002; Zanta MA *et al.*, 1997), le lactose (Choi YH *et al.*, 1999; Choi YH *et al.*, 1998) et l'asialooromucoïde (Cristiano RJ *et al.*, 1993; Wu GY and Wu CH, 1987) ont donc été utilisés pour cibler spécifiquement le foie via le ASPGR. La plupart des systèmes de vectorisation mis au point présentent comme ligand un résidu galactosyl terminal bien que l'affinité du ASPGR soit plus forte pour le résidu GalNAc (Ashwell G and Harford J, 1982; Rensen PC *et al.*, 2001). Ainsi de nombreux systèmes de transfert de gène présentant un motif galactose distal ont été synthétisés à partir de vecteurs synthétiques cationiques comme les lipides cationiques (Frisch B *et al.*, 2004; Gaucheron J *et al.*, 2001), le PEI (Bettinger T *et al.*, 1999; Zanta MA *et al.*, 1997) ou la PLL (Midoux P *et al.*, 1993; Nishikawa M *et al.*, 1998) mais également à partir de peptides (Niidome T *et al.*, 2000).

Plusieurs équipes ont utilisé comme ligand des résidus polysaccharidiques car il a été montré que l'affinité du ASPGR pour les vecteurs galactosylés dépend de la densité de résidus galactose présents à la surface des complexes vecteur/ADN mais aussi de l'accessibilité des complexes via la longueur de l'espaceur portant le ligand (Kawakami S *et al.*, 1998; Niidome T *et al.*, 2000). De plus lors de la caractérisation du ASPGR, les glycoprotéines qui présentaient trois résidus saccharidiques se liaient plus facilement aux récepteurs (Ashwell G and Harford J, 1982). Par conséquent de nombreux vecteurs triantennés présentant trois galactoses terminaux ont été synthétisés afin de mimer la structure des ligands naturels du ASPGR (Frisch B *et al.*, 2004; Niidome T *et al.*, 2000; Remy JS *et al.*, 1995). Ces vecteurs triantennés ont une meilleure affinité pour le récepteur que les vecteurs biantennés ou monoantennés et conduisent donc à une meilleure efficacité de transfection (Niidome T *et al.*, 2000). Cette plus grande affinité peut être expliquée par un phénomène d'avidité car les ASGPR sont espacés des uns des autres de 25 à 30 Å. Il a été montré qu'un espacement entre les résidus sacchariques de 20 Å permettait une meilleure reconnaissance des particules galactosylées par le ASPGR (Rensen PC *et al.*, 2001). Ainsi, les résidus galactose peuvent être reconnus par plusieurs ASPGR et être ainsi internalisés plus rapidement. Par conséquent, le ciblage du ASGPR nécessite une certaine densité de ligand à la surface des complexes vecteur/ADN pour assurer une transfection optimale.

Plusieurs études ont mis en évidence des molécules lipidiques composées d'une tête polaire comprenant à la fois des polyamines cationiques et des résidus galactosyles (Frisch B *et al.*, 2004; Gaucheron J *et al.*, 2001; Kawakami S *et al.*, 1998). Dans le but de former des complexes stables colloïdalement, ces lipides cationiques galactosylés ont été complexés avec de l'ADN à des rapports de charge (+/-) élevés pour transférer des lignées d'hépatocytes humains comme les cellules HepG2. Cependant, la présence des motifs galactose aux extrémités des lipides cationiques ne conduit qu'à une faible augmentation de la transfection par rapport à celle obtenue avec les lipides cationiques non galactosylés. Cette faible amélioration est due à la forte densité de charges positives présente à la surface de ces lipoplexes qui entraîne majoritairement leur internalisation par endocytose non spécifique malgré les motifs de ciblage greffés aux vecteurs cationiques. Remy *et al.* ont donc décrit la formation de particules dépourvues de chaînes de PEG résultant de l'association de l'ADN avec deux molécules indépendantes correspondant à une

lipopolyamine cationique et à un lipide neutre galactosylé (Remy JS *et al.*, 1995). La transfection des cellules HepG2 met en évidence la forte efficacité de transfection de ces complexes, puisque ces particules conduisent à une expression du transgène 1000 fois supérieure à celle obtenue avec les lipoplexes lipopolyamine/ADN formés sans le lipide neutre galactosylé. Cependant l'addition d'asialofétuine, ligand naturel du ASPGR, dans le milieu de transfection ne permet pas de diminuer l'expression du transgène ce qui remet en cause le mécanisme d'internalisation de ces particules.

D'autres approches pour transfecter spécifiquement les cellules HepG2 ont été réalisées avec d'autres vecteurs synthétiques cationiques comme la PLL ou le PEI. La PLL galactosylée (Gal-PLL) permet d'améliorer significativement l'efficacité de transfection de la PLL non substituée mais la présence des charges positives résiduelles apportées par les fonctions amines de la PLL empêche d'éliminer l'internalisation des complexes Gal-PLL/ADN par endocytose non spécifique (Choi YH *et al.*, 1998; Han J and Yeom Y I, 2000; Midoux P *et al.*, 1993; Nishikawa M *et al.*, 1998). Cependant, l'ajout de chloroquine est nécessaire pour observer une transfert de gène efficace que se soit avec la PLL galactosylée ou non galactosylée, ce qui limite leur application *in vivo* (Midoux P *et al.*, 1993). Par conséquent, plusieurs équipes ont utilisé le PEI comme vecteur synthétique pour former de nouveaux systèmes efficaces pour le transfert de gène capables de cibler spécifiquement les cellules hépatiques sans addition d'agents endosomolytiques dans le milieu de transfection. Le PEI galactosylé (Gal-PEI) est généralement synthétisé par amination réductrice entre le PEI et les résidus galactosyles pour conduire à un pourcentage de greffage optimal de 5% des fonctions amines totales du PEI (Bettinger T *et al.*, 1999; Sagara K and Kim SW, 2002; Zanta MA *et al.*, 1997). Pour éviter une internalisation des polyplexes par interactions électrostatiques, les complexes Gal-PEI/ADN ont été formés à un rapport de charge proche de l'électroneutralité mais ils sont caractérisés par de larges agrégats et sont donc instables colloïdalement. Par conséquent les propriétés physico-chimiques de ces particules telles que la taille et le potentiel zéta ont été étudiées (Zanta MA *et al.*, 1997). Malgré les efforts pour diminuer la taille des complexes, ils présentent encore une densité de charges positives résiduelles. Par conséquent, les polyplexes Gal-PEI/ADN ne conduisent qu'à une faible amélioration de l'efficacité de transfection des complexes non galactosylés (Bettinger T *et al.*, 1999; Choi YH *et al.*, 1998; Morimoto K *et al.*, 2003; Zanta MA *et al.*, 1997). Ainsi, la présence des charges

positives résiduelles à la surface des complexes vecteur/ADN tend à montrer que non seulement les complexes sont internalisés par une endocytose spécifique récepteur-dépendant via le ASPGR mais également par une endocytose non spécifique, par interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires. Néanmoins, ces complexes galactosylés sont capables de transférer *in vivo* les cellules hépatiques après injection systémique mais ils conduisent à une faible augmentation de l'expression du transgène par rapport à celle obtenue avec les particules non galactosylées (Hashida M *et al.*, 2001; Sliedregt LA *et al.*, 1999). De plus, l'efficacité de transfection des complexes vecteurs galactosylés/ADN n'est que faiblement inhibée par une préinjection d'ASF, ligand naturel du ASPGR (Sliedregt LA *et al.*, 1999). Ainsi, il semblerait que les systèmes de transfert de gène galactosylé ne soit pas internalisés uniquement par la voie d'endocytose récepteur-dépendant via le ASPGR. Les complexes vecteur/ADN peuvent être internalisés par interactions non spécifiques avec les membranes cellulaires car ils présentent à leur surface une densité de charges positives résiduelles. En effet après injection systémique, l'expression du transgène est également détecté dans d'autres organes que le foie comme le cœur, la rate ou les poumons (Hashida M *et al.*, 2001). De plus, les cellules de Kupffer ou macrophages de foie (cellules non parenchymateuses) présentent à leur surface des récepteurs capables de reconnaître des résidus galactosyles portés par les complexes vecteur/ADN transfectant ainsi d'autres cellules que les hépatocytes (Nishikawa M, 2005; Sliedregt LA *et al.*, 1999; Spiess M, 1990). Par conséquent, lors des études *in vivo*, il convient de différencier l'expression du gène rapporteur obtenue dans cellules de Kupffer avec celle détectée dans les hépatocytes.

De plus, comme pour les études de transfection *in vitro*, les études *in vivo* ont également mis en évidence que le poids moléculaire, le degré de substitution des vecteurs synthétiques et l'espacement entre les résidus galactosyles sont des facteurs déterminant pour la stabilité, l'accessibilité au récepteur et l'efficacité de transfection des complexes vecteurs galactosylés/ADN (Kawakami S *et al.*, 2000; Morimoto K *et al.*, 2003; Nishikawa M *et al.*, 1998). L'efficacité de transfection *in vivo* des complexes vecteurs galactosylés/ADN dépend également de la taille des particules car après injection systémique les systèmes doivent être capables de passer au travers de l'endothélium fenestré du foie dont la taille des jonctions fenestrées est de l'ordre de 200 nm pour pouvoir accéder aux hépatocytes (Anwer K

*et al.*, 2000; Hashida M *et al.*, 2001; Morimoto K *et al.*, 2003). Les complexes vecteurs galactosylés/ADN sont ensuite internalisés par la voie d'endocytose récepteur-dépendant dont la limite d'internalisation des particules se situe entre 200 et 300 nm. Par conséquent, la taille des systèmes galactosylés pour le transfert de gène *in vivo* après injection systémique, ne doit pas dépasser 200 nm de diamètre (Conner SD and Schmid SL, 2003).

La plupart des systèmes de vectorisation utilisés pour le transfert de gène dans le foie ne permettent pas de conduire à un ciblage spécifique des hépatocytes *in vitro* et *in vivo*. En effet, ces systèmes ne sont pas uniquement internalisés dans les cellules hépatiques par endocytose récepteur-dépendant mais également par interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires chargées négativement de par la densité de charges positives présente à la surface des complexes vecteur/ADN. Ainsi après injection systémique, le gène rapporteur est détecté dans d'autres organes que le foie. D'où la nécessité de développer de nouveaux systèmes de délivrance de molécules d'ADN proche de l'électroneutralité afin de s'affranchir des interactions non spécifiques et de conduire ainsi au ciblage spécifique des hépatocytes que se soit *in vitro* ou *in vivo*.

## **III - MATERIEL ET METHODES**

## MATERIEL ET METHODES

---

### 1. Plasmides

Les plasmides pCMV-luc (Ferrari S *et al.*, 1997), pCMV-LacZ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA), pCIK-CAT (gracieusement donné par D.Gill, Oxford, UK), pCMV-GFP (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) encodent, respectivement, les gènes rapporteurs de la luciférase, de la  $\beta$ -galactosidase, de la chloramphénicol-acétyltransférase (CAT) et de la green fluorescent protein (GFP) sous la dépendance du promoteur cytomégalovirus CMV-IE. Le plasmide pQE30 (Qiagen, Courtaboeuf, France) est un plasmide vide construit sans promoteur eucaryote. Tous les plasmides sont amplifiés chez E.Coli, puis purifiés à l'aide de colonnes endotoxines free (Qiagen, Courtaboeuf, France). L'utilisation du kit Qiagen endotoxines free permet de limiter les réactions immunitaires lors de l'injection des plasmides dans les poumons de souris.

### 2. Les copolymères à blocs

Nous avons utilisé deux types de copolymères à blocs pour réaliser les études de transfection *in vitro* et de transfert de gène dans le tissu pulmonaire où ils jouent respectivement, le rôle de stabilisateurs stériques ou de vecteurs synthétiques à part entière.

#### 2.1. Les copolymères à blocs amphiphiles non ioniques

Ils sont composés de motifs (oxydes d'éthylène) $x$ -(oxyde de propylène) $y$ -(oxyde d'éthylène) $x$ . Avec  $x=75$  et  $y=30$  pour le F68 (8400 Da) et  $x=127$  et  $y=50$  pour le F108 (14600 Da).

#### 2.2. Les copolymères à blocs amphiphiles ioniques

Ce sont des composés tétrafonctionnalisés amphiphiles constitués de motifs [(oxydes d'éthylène) $x$ -(oxydes de propylène) $y$ ] $_2$ -éthylène diamine (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N)-[(oxydes d'éthylène) $x$ -(oxydes de propylène) $y$ ] $_2$ . Avec  $x=13$  et  $y=14$  pour le 704 (5500 Da).



L'ensemble des copolymères à blocs proviennent de BASF (Mount Olive, NJ) et les solutions stocks sont préparées à 20% (w/v) dans de l'eau injectable (eau PPI), puis conservées à 4°C.

### 3. Glycosylation des extrémités distales des copolymères à blocs.

La fonctionnalisation des copolymères à blocs par des motifs glycopyranosides est réalisée par voie enzymatique ou par synthèse chimique. Les produits ont été caractérisés par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . Les spectres RMN ont été réalisés sur un appareil Bruker DRX 400 à 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) et 100,6 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Les produits sont dissous dans des solvants deutérés appropriés ( $\text{CDCl}_3$  et  $\text{D}_2\text{O}$ ). Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en partie par million (ppm). Les constantes de couplage ( $J$ ) sont données en Hz et la multiplicité des signaux est indiquée selon les abbréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublet), t (triplet) et m (multiplet).

#### 3.1. Glycosylation enzymatique

##### 3.1.1. Galactosylation

1-O-F68- $\beta$ -D-galactopyranoside (**F68-gal 3a**) :

Le *p*-nitrophényl  $\beta$ -D-galactopyranoside (*p*NP- $\beta$ -gal **2**, 1,07 g, 3,5 mmol, 100 éq.) et la  $\beta$ -galactosidase d'*Aspergillus Oryzae* (900 mg, 8,9 unités) sont successivement additionnés sous agitation à température ambiante à une solution de polymère F68 **1** (300 mg, 0,035 mmol) dans un mélange de tampon acétate (100 mM, pH 4,5, 19,2 mL) et de DMF (2,1 mL). Le milieu réactionnel est incubé pendant 15h à 30°C puis la réaction est stoppée par dénaturation de l'enzyme par chauffage à 100°C pendant 5 minutes. La solution est ensuite purifiée par dialyse (SnakeSkin<sup>®</sup>, Pierce, MCWO 3500 Da) à 4°C contre de l'eau (6 × 1,5 L), l'enzyme est séparée par ultracentrifugation (filtres Amicon Ultra-15, Millipore, MCWO 30 000 Da) et la lyophilisation de la solution permet d'obtenir le produit **F68-gal** sous forme d'un solide blanc pulvérulent (252 mg, 25% d'incorporation de galactose). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  = 4,30 (d,  $J$  = 7,8 Hz, 1H,  $\text{H}_1$  gal), 3,67-3,40 (m,  $\text{H}_{2,3,4,5,6}$  gal,  $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$ ,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ), 1,06-1,03 (m,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ).

1-O-F108- $\beta$ -D-galactopyranoside (**F108-gal 3b**) :

Le produit **F108-gal** est obtenu à partir du polymère F108 **1** (300 mg, 0,02 mmol), sous forme d'un solide blanc pulvérulent (278 mg, 25% d'incorporation de galactose)

selon le mode opératoire décrit ci-dessus. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 4,30$  (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$  gal), 3,67-3,29 (m,  $\text{H}_{2,3,4,5,6}$  gal,  $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$ ,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ), 1,09-1,06 (m,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ).

### 3.1.2. Glucosylation

*1-O-F68- $\beta$ -D-glucopyranoside* (**F68-glc 5a**) :

Le *p*-nitrophényl  $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NP- $\beta$ -glc **4**, 538 mg, 1,8 mmol, 100 éq.) et la  $\beta$ -glucosidase d' Amande (*Prunus Dulcis*) (4 mg, 26 unités) sont successivement additionnés sous agitation à température ambiante à une solution de polymère F68 **1** (150 mg, 0,018 mmol) dans un mélange de tampon acétate (100 mM, pH 4,5, 16 mL) et de DMF (1,8 mL). Le milieu réactionnel est incubé pendant 8h à 30°C puis la réaction est stoppée par dénaturation de l'enzyme par chauffage à 100°C pendant 5 minutes. La solution est ensuite purifiée par dialyse (SnakeSkin<sup>®</sup>, Pierce, MCWO 3500 Da) à 4°C contre de l'eau (6  $\times$  1,5 L), l'enzyme est séparée par ultracentrifugation (filtres Amicon Ultra-15, Millipore, MCWO 30 000 Da) et la lyophilisation de la solution permet d'obtenir le produit **F68-glc** sous forme d'un solide blanc pulvérulent (105 mg, 36% d'incorporation de glucose). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta = 3,95$  (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$  gal), 3,76-3,44 (m,  $\text{H}_{2,3,4,5,6}$  gal,  $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$ ,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ), 1,06-1,03 (m,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ).

*1-O-F108- $\beta$ -D-glucopyranoside* (**F108-glc 5b**) :

Le produit **F108-glc** a été obtenu à partir du polymère F108 **1** (300 mg, 0,02 mmol), sous forme d'un solide blanc pulvérulent (175 mg, 36% d'incorporation de glucose) selon le mode opératoire décrit ci-dessus. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 3,93$  (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$  gal), 3,80-3,41 (m,  $\text{H}_{2,3,4,5,6}$  gal,  $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$ ,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ), 1,09-1,03 (m,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta = 96,6$  ( $\text{C}_1$ ), 87,7 ( $\text{C}_5$ ), 75,7 ( $\text{C}_3$ ), 75,2, 74,9, 72,7, 72,4, 72,2, 71,2, 70,9, 70,4, 69,4, 69,2, 68,4, 67,9 ( $\text{C}_2$ ), 62,9 ( $\text{C}_4$ ), 61,0, 60,8, 57,8 ( $\text{C}_6$ ), 17,2, 16,6.

### 3.2. Glycosylation chimique

#### 3.2.1. Galactosylation

*2,3,4,6-tétra-O-acétyl-D-galactopyranoside (6)* :

Sous atmosphère inerte, l'acétate d'hydrazine (192,9 mg, 2,10 mmol, 1,35 éq) est ajoutée à une solution de penta-O-acétyl-β-D-galactopyranoside (602,9 mg, 1,55 mmol) dans du THF anhydre (6 mL) en présence de tamis moléculaire 4Å. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 h 30, concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie sur gel de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH ; 25:1) pour donner le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-D-galactopyranoside **6** (479,9 mg, 89%) sous forme d'une huile jaune. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 5,50 (m, 0.5H, H<sub>1α</sub>), 5,42 (m, 0.5H, H<sub>1β</sub>), 5,15 (dd, *J* = 2,7 et 8,9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 5,07 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 4,13 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 4,09 (m, 2H, H<sub>5,6b</sub>), 3,85 (m, 1H, H<sub>6a</sub>), 2,15-1,98 (m, 12H, CH<sub>3</sub>CO).

*2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-O-trichloroacétimidoyl-α-D-galactopyranoside (7)* :

Sous atmosphère inerte, le carbonate de potassium (1,27 g, 9,24 mmol, 6,7 éq) et le trichloroacétonitrile (1,22 mL, 12,2 mmol, 8,8 éq) sont successivement additionnés à une solution du composé **6** (479,9 mg, 1,38 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (20 mL) en présence de tamis moléculaire 4Å. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12 h puis filtré et évaporé pour donner le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-O-trichloroacétimidoyl-α-D-galactopyranoside **7** (642,3mg, 95%) sous forme d'une huile incolore. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 8,62 (d, *J* = 19,1 Hz, 1H, NH), 6,55 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H H<sub>1α</sub>), 5,34 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 5,07 (dd, *J* = 3,5 et 10,4 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4,39 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4,15-4,01 (m, 3H, H<sub>5,6</sub>), 1,97 (m, 12H, CH<sub>3</sub>CO).

*2,3,4,6-tetra-O-acétyl-1-O-F68-β-D-galactopyranoside (F68-galAc<sub>4</sub> 8)* :

Sous atmosphère inerte, l'éthérate de trifluorure de bore (160 μL, 1,3 mmol, 12 éq) est additionné à une solution de polymère F68 (949 mg, 0,11 mmol) et de composé **7** (556 mg, 1,13 mmol, 10 éq) dans du dichlorométhane anhydre (20 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h puis concentré sous pression réduite. Le résidu est ensuite dilué dans une solution de tampon phosphate (120 mM, pH 7, 10 mL), purifié par dialyse (Membranes Pierce SnakeSkin<sup>®</sup>, MCWO 3 500 Da) à 4°C contre de l'eau (6 × 1,5 L) puis lyophilisé pour donner le **F68-galAc<sub>4</sub>**

sous forme d'un solide blanc pulvérulent (809 mg, 44% d'incorporation de galactose). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 5,32 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ), 5,14 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4,96 (dd,  $J$  = 3,4 et 10,4 Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), 4,50 (d,  $J$  = 7,96 Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 4,16-4,09 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{OgalAc}_4$ ,  $\text{H}_6$ ), 3,84-3,28 (m,  $\text{H}_5$ ,  $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$ ,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ), 2,08, 2,01, 1,98 et 1,92 (4 x s, 4 x 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1,09-1,07 (m,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ).

*2,3,4,6-tetra-O-acétyl-1-O-F108- $\beta$ -D-galactopyranoside* (**F108-galAc<sub>4</sub> 9**) :

Le produit **F108-galAc<sub>4</sub>** a été obtenu à partir du polymère F108 (1,97 g, 0,13 mmol), sous forme d'un solide blanc pulvérulent (1,2 g, 34% d'incorporation de galactose) selon le mode opératoire décrit ci-dessus. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 5,31 (d,  $J$  = 3,4 Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 5,13 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4,96 (dd,  $J$  = 3,4 et 10,4 Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), 4,50 (d,  $J$  = 7,98 Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 4,15-4,07 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{OgalAc}_4$ ,  $\text{H}_6$ ), 3,84-3,26 (m,  $\text{H}_5$ ,  $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$ ,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ), 2,09, 2,02, 1,98 et 1,91 (4 x s, 4 x 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1,09-1,06 (m,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ).

*2,3,4,6-tetra-O-acétyl-1-O-704- $\beta$ -D-galactopyranoside* (**704-galAc<sub>4</sub> 14**) :

Sous atmosphère inerte, l'éthérate de trifluorure de bore (200  $\mu\text{L}$ , 1,62 mmol, 25 éq) est additionné à une solution de polymère 704 (377,6 mg, 69  $\mu\text{mol}$ ) et de composé **7** (509,4 mg, 1,03 mmol, 15 éq) dans du dichlorométhane anhydre (20 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h puis concentré sous pression réduite. Le résidu est ensuite dilué dans une solution de tampon phosphate (120 mM, pH 7, 10 mL), purifié par dialyse (Membranes Cellu•Sep<sup>®</sup> H1, MCWO 2 000 Da) à 4°C contre de l'eau (6 x 1,5 L) puis lyophilisé pour donner le **704-galAc<sub>4</sub>** sous forme d'une huile jaune (290 mg, 65% d'incorporation de galactose). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 5,36 (dd,  $J$  = 1,0, 3,4 Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 5,17 (dd,  $J$  = 8,0 et 10,4 Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4,99 (dd,  $J$  = 3,4 et 10,4 Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), 4,54 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 4,23-4,07 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{OgalAc}_4$ ,  $\text{H}_6$ ), 3,95-3,18 (m,  $\text{H}_5$ ,  $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$ ,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2,13, 2,04, 2,03 et 1,96 (4 x s, 4 x 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1,26-1,03 (m,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ) ; RMN  $^{13}\text{C}$  (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 170,5, 170,4, 170,2 et 169,6 (C=O), 101,5 ( $\text{C}_1$ ), 75,6, 75,4, 75,2, 73,5, 73,1, 73,0, 72,7, 71,0, 70,8, 70,7, 70,5, 70,4, 69,9, 69,2, 68,9, 68,7, 68,6 ( $\text{C}_2$ ), 67,2 ( $\text{C}_4$ ), 63,7, 61,8, 61,4 ( $\text{C}_6$ ), 29,8, 20,9, 20,8 x 2 et 20,7 (4 x  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 17,6, 17,4.

*1-O-F68-β-D-galactopyranoside (F68-gal 3a):*

Le **F68-galAc<sub>4</sub> 8** (420 mg, 47 μmol) est ajouté à une solution de méthanoate de sodium fraîchement préparée (200 mM, 4,2 mL, 0,84 mmol, 18 eq) et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h puis concentré sous pression réduite. Le résidu est ensuite dilué dans une solution de tampon phosphate (120 mM, pH 7, 10 mL), purifié par dialyse (Membranes Pierce SnakeSkin<sup>®</sup>, MCWO 3 500 Da) à 4°C contre de l'eau (6 × 1,5 L) puis lyophilisé pour donner le **F68-gal** sous forme d'un solide blanc pulvérulent (390 mg, réaction quantitative, 44% d'incorporation de galactose). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ = 4,30 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4,0-3,92 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ogal), 3,83-3,34 (m, H<sub>2,3,4,5,6</sub> [CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>, [CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>n</sub>), 1,16-0,92 (m, [CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>n</sub>).

*1-O-F108-β-D-galactopyranoside (F108-gal 3b):*

Le produit **F108-gal** est obtenu à partir du composé **F108-galAc<sub>4</sub> 9** (675 mg, 45 μmol), sous forme d'un solide blanc pulvérulent (610 mg, 34% d'incorporation de galactose) selon le mode opératoire décrit ci-dessus. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ = 4,31 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 3,77-3,74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ogal), 3,67-3,38 (m, H<sub>2,3,4,5,6</sub> [CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>, [CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>n</sub>), 1,08-1,06 (m, [CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>n</sub>).

*1-O-704-β-D-galactopyranoside (704-gal 15):*

Le produit **704-gal** est obtenu à partir du composé **704-galAc<sub>4</sub> 14** (296 mg, 43 μmol), sous forme d'une huile jaune après purification par dialyse (Membranes Cellu-Sep<sup>®</sup> H1, MCWO 2 000 Da) à 4°C contre de l'eau (6 × 1,5 L) et lyophilisation (246 mg, 65% d'incorporation de galactose) selon le mode opératoire décrit ci-dessus. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 4,32 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4,18-4,12 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ogal), 4,08-3,05 (m, H<sub>2,3,4,5,6</sub> [CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>, [CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>n</sub>, CH<sub>2</sub>N), 1,26-1,06 (m, [CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>n</sub>) ; RMN <sup>13</sup>C (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 103,6 (C<sub>1</sub>), 75,6, 75,5, 75,3, 74,6 (C<sub>5</sub>), 73,8 (C<sub>3</sub>), 73,5, 73,1, 73,0, 72,7, 71,5 (C<sub>2</sub>), 71,0, 70,7, 70,5, 69,5 (C<sub>4</sub>), 68,8, 68,7, 68,6, 66,6, 62,7, 61,9 (C<sub>6</sub>), 18,6, 18,2, 17,6, 17,5.

**3.2.2. Mannosylation***2,3,4,6-tétra-O-acétyl-D-mannopyranoside (10) :*

Sous atmosphère inerte, l'acétate d'hydrazine (190 mg, 2,06 mmol, 1,35 éq) est ajoutée à une solution de penta-O-acétyl-α-D-mannopyranoside (596 mg 1,53 mmol)

dans du THF anhydre (6 mL) en présence de tamis moléculaire 4Å. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 h 30, concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie sur gel de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ CH<sub>3</sub>OH ; 25:1) pour donner le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-D-mannopyranoside **10** (383,3 mg, 78%) sous forme d'une huile jaune. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ = 5,41 (m, 0.5H, H<sub>1α</sub>), 5,40 (m, 0.5H, H<sub>1β</sub>), 5,31-5,19 (m, 3H, H<sub>4,3,2</sub>), 4,30-4,06 (m, 3H, H<sub>5,6a,6b</sub>), 2,21-1,98 (m, 12H, CH<sub>3</sub>CO). RMN <sup>13</sup>C (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 176,2, 171,2, 170,5 et 170,2 (C=O), 92,6 (C<sub>1</sub>), 71,5 (C<sub>4</sub>) 69,2 (C<sub>3</sub>), 68,9 (C<sub>2</sub>), 66,6 (C<sub>5</sub>), 62,9 (C<sub>6</sub>), 21,3, 21,2, 21,1 et 20,9 (4 × CH<sub>3</sub>CO).

*2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-O-trichloroacétimidoyl-α-D-mannopyranoside (11) :*

Sous atmosphère inerte, le carbonate de potassium (836 mg, 6,05 mmol, 6,7 éq) et le trichloroacétonitrile (0,78 mL, 7,8 mmol, 8,8 éq) sont successivement additionnés à une solution du composé **10** (310 mg, 0,89 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (20 mL) en présence de tamis moléculaire 4Å. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12 h puis filtré et évaporé pour donner le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-O-trichloroacétimidoyl-α-D-mannopyranoside **11** (457 mg, 96%) sous forme d'une huile incolore.

*2,3,4,6-tetra-O-acétyl-1-O-F108-α -D-mannopyranoside (F108-manAc<sub>4</sub> 12) :*

Sous atmosphère inerte, l'éthérate de trifluorure de bore (160 µL, 1,3 mmol, 14 éq) est additionné à une solution de polymère F108 (1,40 g, 93 µmol) et de composé **11** (457 mg, 0,93 mmol, 10 éq) dans du dichlorométhane anhydre (20 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h puis concentré sous pression réduite. Le résidu est ensuite dilué dans une solution de tampon phosphate (120 mM, pH 7, 10 mL), purifié par dialyse (Membranes Pierce SnakeSkin®, MCWO 3 500 Da) à 4°C contre de l'eau (6 × 1,5 L) puis lyophilisé pour donner le **F108-manAc<sub>4</sub>** sous forme d'un solide blanc pulvérulent (854 mg, 38% d'incorporation de mannose). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 5,31 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 5,13 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 4,96 (dd, *J* = 3,4, 10,4 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 4,50 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4,15-4,07 (m, 4H, CH<sub>2</sub>OgalAc<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>), 3,84-3,26 (m, H<sub>5</sub>, [CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>, [CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>n</sub>), 2,09, 2,02, 1,98 et 1,91 (4 × s, 4 × 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1,09-1,06 (m, [CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>n</sub>).

*2,3,4,6-tetra-O-acétyl-1-O-704- $\alpha$ -D-mannopyranoside (704-manAc4 16) :*

Sous atmosphère inerte, l'éthérate de trifluorure de bore (200  $\mu$ L, 1,62 mmol, 25 éq) est additionné à une solution de polymère 704 (377,6 mg, 69  $\mu$ mol) et de composé 11 (509,4 mg, 1,03 mmol, 15 éq) dans du dichlorométhane anhydre (20 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h puis concentré sous pression réduite. Le résidu est ensuite dilué dans une solution de tampon phosphate (120 mM, pH 7, 10 mL), purifié par dialyse (Membranes Cellu•Sep® H1, MCWO 2 000 Da) à 4°C contre de l'eau (6  $\times$  1,5 L) puis lyophilisé pour donner le 704-manAc4 sous forme d'une huile jaune (290 mg, 35% d'incorporation de mannose). RMN  $^1$ H (400 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  = 5,36 (dd,  $J$  = 3,4, 10,1 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 5,30-5,25 (m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>), 4,86 (d,  $J$  = 3,3 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 4,34-4,13 (m, 4H, CH<sub>2</sub>OgalAc<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>), 3.80-3.21 (m, [CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>, [CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>n</sub>, CH<sub>2</sub>N), 2,15, 2,10, 2,03 et 1,98 (4  $\times$  s, 4  $\times$  3H, CH<sub>3</sub>CO), 1,15-1,05 (m, [CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>n</sub>) ; RMN  $^{13}$ C (100,6 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  97,9 (C<sub>1</sub>), 77,5, 77,2, 76,8, 75,7, 75,5, 73,5, 73,0, 72,7, 71,0, 70,7, 70,5, 70,1, 69,2 (C<sub>2</sub>), 68,7(C<sub>4</sub>), 66,3, 62,6, 61,9 (C<sub>6</sub>), 29,8, 21,0  $\times$  2 et 20,8 (4  $\times$  CH<sub>3</sub>CO), 17,6, 17,4.

*1-O-F108- $\alpha$ -D-mannopyranoside (F108-man 13):*

Le **F108-manAc<sub>4</sub> 12** (854 mg, 57  $\mu$ mol) est ajouté à une solution de méthanoate de sodium fraîchement préparée (200 mM, 8,5 mL, 1,7 mmol, 29 eq) et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h puis concentré sous pression réduite. Le résidu est ensuite dilué dans une solution de tampon phosphate (120 mM, pH 7, 10 mL), purifié par dialyse (Membranes Pierce SnakeSkin®, MCWO 3 500 Da) à 4°C contre de l'eau (6  $\times$  1,5 L) puis lyophilisé pour donner le **F108-gal** sous forme d'un solide blanc pulvérulent (710 mg, réaction quantitative, 38% d'incorporation de mannose).

*1-O-704- $\alpha$ -D-mannopyranoside (704-man 15) :*

Le produit **704-man** est obtenu à partir du composé **704-manAc<sub>4</sub> 15** (296 mg, 43  $\mu$ mol), sous forme d'une huile jaune après purification par dialyse (Membranes Cellu•Sep® H1, MCWO 2 000 Da) à 4°C contre de l'eau (6  $\times$  1,5 L) et lyophilisation (246 mg, 35% d'incorporation de mannose) selon le mode opératoire décrit ci-dessus. RMN  $^1$ H (400 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  = 4,87 (d,  $J$  = 3,4 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 3,85-3,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OGal), 3,70-3,25 (m, H<sub>2,3,4,5,6</sub> [CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>, [CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>n</sub>, CH<sub>2</sub>N), 1,22-

1,02 (m,  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$ ) ; RMN  $^{13}\text{C}$  (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 100,5 ( $\text{C}_1$ ), 77,7, 77,4, 77,1, 76,2, 75,9, 75,7 ( $\text{C}_5$ ), 74,9 ( $\text{C}_3$ ), 74,2, 74,0, 73,7, 73,3 ( $\text{C}_2$ ), 73,0, 72,3 ( $\text{C}_4$ ), 72,1, 71,2, 70,9, 70,6, 68,9, 67,1, 62,1 ( $\text{C}_6$ ), 18,9, 18,6, 17,8, 17,7.

#### **4. Chromatographie d'exclusion stérique (CES)**

Les analyses par CES sont réalisées sur une chaîne CLHP (chromatographie liquide à haute pression) JASCO 2000 (JASCO, Japan) couplée à un détecteur à diffusion de la lumière (SEDEX-75, Sedere, France) ( $N_2=3,5$  bar ; gain=8 ;  $t=40^\circ\text{C}$ ).

Les stabilisateurs stériques galactosylés ou non galactosylés sont préparés à une solution de 1 g/L puis injectés sur une colonne TSK Gel Super SW 3000 (300 mm x 4,6 mm, 4  $\mu\text{m}$ , Tosohaas). La phase mobile est constituée d'un mélange  $\text{H}_2\text{O}$ /méthanol (50 :50, v/v) dont le débit est de 0,15 mL/min.

#### **5. Lipides cationiques**

Le dérivé lipidique d'aminoglycosides, la DOSP (dioleylamine-succinyl-paromomycine) dont la synthèse a été précédemment décrite (Sainlos M, 2004; Sainlos M *et al.*, 2005; Vigneron JP *et al.*, 1996), présente 4 groupements d'amines protonables par molécule. Ce lipide cationique est utilisé, soit sous forme de liposomes, soit sous forme de micelles. La formation des liposomes requiert la présence d'un co-lipide neutre, la DOPE (DioleoylPhosphatidylEthanolamine (DOPE) (Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids Inc, Alabaster, AL, USA). La DOSP et la DOPE sont mélangées dans une solution de chloroforme à un rapport molaire de 1:1. La solution de chloroforme est ensuite évaporée sous vide, puis le film lipidique formé est resuspendu dans de l'eau distillée pendant 24 heures à  $4^\circ\text{C}$ . La solution est ensuite vortexée puis placée dans un bain à ultra-sons pendant 10 min, pour obtenir les liposomes à une concentration finale de 5 g/L. Pour former les micelles, la DOSP est dissoute dans de l'eau distillé puis placée dans un bain d'ultra-sons pendant 10 min. La concentration finale des micelles est également de 5 g/L.

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



## **6. Formulation des lipoplexes**

### **6.1. Formulation du système multimodulaire**

La formulation de l'ADN avec les lipides cationiques (DOSP/DOPE, DOSP et BGTC/DOPE) est obtenue par mélange équimoléculaire des différentes solutions de liposomes ou de micelles avec l'ADN, à la concentration désirée. La formation des complexes avec les stabilisateurs stériques galactosylés ou non galactosylés a été réalisée comme précédemment, en mélangeant les solutions de liposomes ou de micelles contenant différentes concentrations de stabilisateurs stériques, à une solution d'ADN plasmidique à 300 mM de NaCl.

### **6.2. Formulation de l'ADN avec les copolymères à blocs pour le transfert de gène dans le tissu pulmonaire**

Les complexes copolymère à blocs/ADN sont obtenus par un mélange équimoléculaire des solutions de copolymères à blocs galactosylés ou non galactosylés à différentes concentrations avec l'ADN préparé dans une solution physiologique.

## **7. Caractérisation physico-chimique des lipoplexes**

### **7.1. Mesure de la taille des complexes**

Les mesures de taille des lipoplexes sont réalisées sur un Zetasizer 300HSA (Malvern, Worcestershire, United Kingdom) à 20°C comme précédemment décrit (Pitard B *et al.*, 1997; Pitard B *et al.*, 1999) Les échantillons sont préparés par complexation de l'ADN aux lipides cationiques, sous forme de liposomes (DOSP/DOPE et BGTC/DOPE) ou de micelles (DOSP) à différents rapports de charge, en présence ou en absence de stabilisateurs stériques galactosylés ou non galactosylés à différents rapports w/w.

### **7.2. Mesure de la fluorescence du BET en solution**

Les mesures de fluorescence du bromure d'éthidium (BET) sont réalisées sur un spectrofluorimètre Kontron SFM25 à une longueur d'onde d'excitation de 260 nm et d'émission de 590 nm. Un microlitre d'une solution de BET (Sigma, St Louis, MO, USA) à 1 mg/mL a été ajouté à 1 mL de la solution contenant les lipoplexes qui ont

été formés à une concentration d'ADN de 40 µg/mL. Les mesures sont réalisées dans une cuve en quartz SUPRAZIL de 0,5 ml, et 10 mm de côté (Hellma, France).

### **7.3. Migration sur gel d'agarose**

La formation des complexes est confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les gels sont préparés à 1% en agarose dans une solution de Tris-Acétate-EDTA (TAE) contenant 40 mM de Tris-Acétate, 1mM d'EDTA (pH 8,3) et du BET à 5 µM. Les échantillons sont préalablement mélangés au tampon de charge OrangeBlue (Promega, Madison, WI, USA) avant l'électrophorèse qui a duré 20 min à 100 V. Le TAE est utilisé comme tampon lors de la migration. Les gels sont révélés puis photographiés sous lumière UV par un Alpha Innotech Imager 2000 Multimage Light Cabinet Camera (Alpha Innotech, San Leonardo, CA).

### **7.4. Cryo-microscopie à transmission (Cryo-TEM)**

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

## **8. Caractérisation de taille des lipoplexes dans du milieu de transfection**

Les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal au rapport de charge de 2 et au rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300 ainsi que les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN au rapport de charge de 4, sont préparés après le mélange de 50 µL d'une solution de BGTC/DOPE avec ou sans F108-gal à 50 µL d'une solution d'ADN plasmidique à 300 mM de NaCl. Les échantillons sont analysés à température ambiante 20 min après la complexation. Juste avant les mesures de taille par diffusion quasi-élastique de la lumière, 1000 µL de NaCl à 150 mM ou de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (plus les additifs nécessaires à la culture des hépatocytes primaires) ont été ajoutés aux lipoplexes. Les mesures de taille des lipoplexes dilués dans le NaCl ou le DMEM sont réalisées toutes les heures.

## **9. Culture primaire d'hépatocytes**

Les hépatocytes sont isolés à partir de foies de rats mâles par la méthode collagénase (Berry MN and Friend DS, 1969), modifiée comme décrit précédemment

(Balavoine S *et al.*, 1993; Dentin R *et al.*, 2004). Les foies sont perfusés avec une solution sodique de Hank puis lavés par la veine cave inférieure à un flux de 5 mL/min avant l'ajout de la collégénase (0,025%). Les cellules mortes sont éliminées par percoll via le gradient de densité. Les cellules viables sont platées sur des plaques coatées au collagène I à une densité de 75 000/cm<sup>2</sup>. Les cellules s'attachent au bout de 2h dans du milieu Williams'E complété avec du Glutamax (Invitrogen), 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio, Courtaboeuf, France), 10 µg/mL de streptomycine, 100 u/mL de pénicilline, 100 nM de dexaméthasone et 100 nM d'insuline (Actrapid, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Danemark).

### **10. Cultures cellulaires**

Les cellules Cos7 (cellules de fibroblastes de rein du grand singe d'Afrique) et les lignées d'hépatocytes humains (HepG2, IHH, HuH7 et Hep 3B) sont cultivées en flasques, sous atmosphère humidifiée à 37°C et à un pourcentage de CO<sub>2</sub> de 5%, dans du milieu de culture DMEM (GIBCO, Invitrogen Life technologies, Carlsbad, CA, USA) complété par 10% de SVF, 2 mM de L-glutamine, 10 µg/mL de streptomycine et 100 u/mL de pénicilline (GIBCO, Invitrogen Life technologies, Carlsbad, CA, USA). Les cellules sont platées 24h avant la transfection à une densité de 35 000/cm<sup>2</sup> pour les cellules Cos7 et de 75 000/cm<sup>2</sup> pour les 4 lignées d'hépatocytes.

### **11. Transfection cellulaire**

Les lipoplexes lipides cationiques-ADN/stabilisateurs stériques galactosylés ou non galactosylés sont incubés à température ambiante 15-20 min avant la transfection. 50 µL des complexes sont ajoutés à 300 µL de milieu dépourvu de sérum. 4h après la transfection, le milieu est remplacé soit par 1 mL de milieu contenant 10% de SVF pour les Cos7, soit par 1 mL de milieu sans sérum pour les hépatocytes en culture. Les cellules sont laissées 20h de plus à l'incubateur avant le dosage de l'expression du transgène.

### **12. Dosage de la luciférase par chimioluminescence**

Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules sont lavées deux fois avec 500 µL de PBS (Phosphate Buffer Saline) (Promega, Madison, WI) puis lysées dans 300 µL du tampon de lyse RLB (Reporter Lysis 1X Buffer, Promega, Madison, WI)

complété avec un cocktail d'anti-protéase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). La lyse complète des cellules a été assurée par un cycle de refroidissement -80°C/20°C. Chaque échantillon est transféré dans un tube eppendorf puis centrifugé 5 min à 10000 rpm. L'activité de la luciférase est détectée à l'aide du Luciferase assay system (Promega, Madison, WI) où 100 µL du substrat de la luciférase sont mélangés à 20 µL de surnageant de l'échantillon. Elle est ensuite mesurée par luminométrie sur le lecteur multi-plaque Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer, les Ulis, France). La concentration en protéine totale de chaque échantillon est dosée à l'aide du kit Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

### **13. Formulation et transfection de l'ADN marqué au YOYO-1**

Le YOYO-1 est une sonde fluorescente (Eugene, USA) qui s'intercale entre les paires bases de l'ADN. Le plasmide luciférase est mélangé à une solution de YOYO-1 (0,1 mM dans du DMSO) afin d'obtenir un rapport sonde/paires de base de 150. Ce rapport correspond à une molécule de YOYO-1 toutes les 150 paires de base du plasmide luciférase. Le mélange est incubé 10 min à température ambiante avant de former les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés soit à un rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2 en présence de F108-gal ou de F108 à un rapport F108/ADN (w/w) de 300, soit à un rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 4. Les hépatocytes primaires sont incubés pendant 4h avec les lipoplexes puis le milieu de transfection est remplacé par 1 mL de milieu neuf sans sérum. 24h après la transfection, les cellules sont lavées 2 fois au PBS et fixées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont à nouveau rincées 2 fois au PBS puis montées sur lames en présence d'un milieu de montage fluorescent (DAKO, Carpentina, CA, USA). Les cellules sont ensuite observées à l'aide d'un microscope inversé Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) sous un filtre FITC pour déterminer l'internalisation du YOYO-1 ainsi qu'en contraste de phase.

### **14. Visualisation du transfert de gène**

Les liposomes BGTC/DOPE ont été complexés à un plasmide encodant la GFP (Green Fluorescent Protein) soit à un rapport de 2 en présence de F108-gal ou de F108 à un rapport F108/ADN (w/w) de 300 soit à un rapport de charge BGTC/DOPE-

ADN de 4. Les mêmes lipoplexes ont également été formés avec un plasmide encodant la  $\beta$ -galactosidase. Les hépatocytes primaires sont incubés pendant 4h avec les lipoplexes puis le milieu de transfection est remplacé par 1 mL de milieu neuf sans sérum. 24h après la transfection, les cellules sont lavées 2 fois au PBS et fixées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules transfectées avec les lipoplexes formés avec le plasmide GFP sont à nouveau rincées 2 fois au PBS puis montées sur lames en présence d'un milieu de montage fluorescent (DAKO, Carpentina, CA, USA). Les cellules sont ensuite observées sous un filtre FITC pour détecter la fluorescence de la GFP à l'aide d'un microscope inversé Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

Les cellules transfectées avec les lipoplexes préparés avec le plasmide encodant la  $\beta$ -galactosidase sont rincées 2 fois au PBS puis incubées avec le réactif X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) pendant 12h à 37°. Les cellules sont ensuite observées au microscope optique pour visualiser la  $\beta$ -galactosidase dans les hépatocytes

### **15. Transfert de gène dans les poumons**

Les souris sont anesthésiées par une injection intra-péritonéale d'une solution de kétamine (70 mg/kg) et de xylazine (15 mg/kg). Après l'anesthésie, 100  $\mu$ L de la solution d'ADN complexée aux copolymères à blocs galactosylés ou non galactosylés sont instillés directement dans les poumons par l'intermédiaire d'un cathéter (22G). Pour l'administration des complexes par aérosolisation, les complexes (100  $\mu$ L) sont administrés via un Microsprayer<sup>®</sup> (Penn-Century, Philadelphia, PA).

### **16. Dosage de la protéine CAT par ELISA**

Chaque poumon disséqué est broyé à l'Ultra-Thurax dans 1 mL de RLB supplémenté avec un cocktail d'anti-protéases (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Le broyat est alors centrifugé pendant 5 min à 10000 rpm et à 4°C. La quantité de protéine CAT résiduelle est dosée à partir de 200  $\mu$ L du surnageant à l'aide du kit de détection CAT-ELISA (Roche Applied Science, Meylan, France). Si nécessaire les échantillons sont dilués dans du RLB 1X. L'absorbance est mesurée à 405 nm sur un lecteur multi-plaque Victor<sup>2</sup>. Une gamme de référence est réalisée à

chaque dosage. Parallèlement, un dosage des protéines par la BCA est effectué à l'aide du kit Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

### **17. Immunohistochimie**

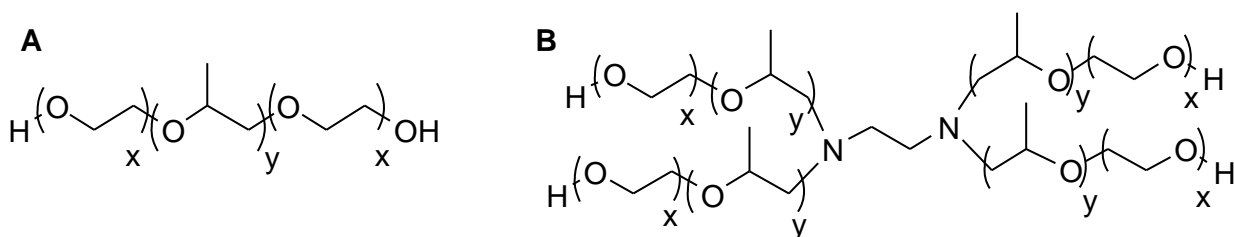
Juste après l'euthanasie des souris, les poumons ont été perfusés avec une solution de fixation (paraformaldéhyde froid à 4% dilué dans du PBS). La trachée est ensuite ligaturée, puis les poumons ont été immergés dans une solution contenant la même solution de fixation. Les poumons sont ensuite maintenus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

## **IV - RESULTATS**

## PARTIE 1 : Synthèse des stabilisateurs stériques fonctionnalisés

### 1. Les stabilisateurs stériques

Les stabilisateurs stériques utilisés dans cette thèse appartiennent à la famille des copolymères à blocs amphiphiles non ioniques et ioniques. Les copolymères à blocs non ioniques (Schéma 1A) tels que le F68 et le F108, sont formés d'un motif central hydrophobe composé d'oxyde de propylène (OP) encadré par deux motifs hydrophiles d'oxyde d'éthylène (OE). Le F68 et le F108 sont constitués tous les deux de 80% d'OE mais présentent des masses moléculaires différentes, respectivement, 8400 Da et 14600 Da. Les copolymères à blocs ioniques, comme le 704, sont composés de 4 blocs OP/OE centrés sur un motif éthylène diamine (Schéma 1B). Le 704 est formé à 40% d'OE et présente une masse moléculaire de 5500 Da.



**Schéma 1: Représentation schématique des stabilisateurs stériques.** Copolymères à blocs amphiphiles non ioniques (A) et ioniques (B) composés d'OE et d'OP.

Deux stratégies de synthèse différentes ont été développées afin de fonctionnaliser les extrémités distales des copolymères à blocs. Ces deux voies de couplage, par voie enzymatique ou par voie chimique, ont conduit à l'obtention de stabilisateurs stériques glycosylés par l'introduction de différents résidus monosaccharidiques tels que le D-galactose, le D-glucose et le D-mannose.

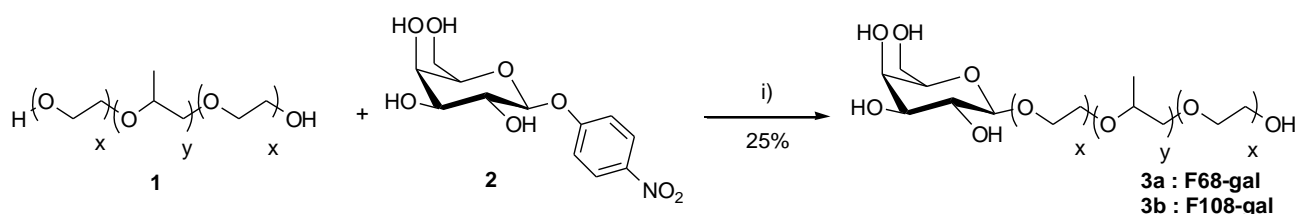


## 2. Fonctionnalisation des copolymères à blocs non ioniques

### 2.1 Synthèse enzymatique

#### 2.1.1 Introduction d'un résidu galactosyle

Les stabilisateurs stériques F68 et F108 ont été fonctionnalisés par galactosylation chimio-enzymatique (Schéma 2). Cette réaction de galactosylation met en jeu une enzyme, la  $\beta$ -galactosidase d'*Aspergillus Oryzae* qui appartient à la famille des glycosylhydrolases. Ces enzymes sont capables de catalyser *in vivo* l'hydrolyse des liaisons  $\beta$ -glycosidiques en position anomère (Rye CS and Withers SG, 2000). Cependant, sous certaines conditions, elles permettent de conduire à la formation de produits de transglycosylation par transfert d'un résidu glycosyle entre un donneur activé, ici le *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside **2** et un accepteur, le stabilisateur stérique **1**. Cette méthode de greffage repose donc sur l'activité transférase de l'enzyme. Cependant, pour favoriser le produit de transglycosylation **3**, il est nécessaire d'utiliser un large excès de donneur (50 éq par fonction alcool libre du stabilisateur stérique). Le milieu réactionnel se compose d'un mélange de cosolvants constitué de 90% de tampon acétate (0,1M, pH 4,5) et de 10% de DMF. La réaction de galactosylation enzymatique est réalisée dans un milieu tamponné (pH 4,5) afin de maintenir les conditions de pH optimum à l'activité de l'enzyme. Le DMF permet de déstabiliser les structures micellaires formées par les stabilisateurs stériques et rendre ainsi les fonctions hydroxyles à galactosyler plus accessible à l'enzyme.



i)  $\beta$ -galactosidase d'*A. Oryzae*, tampon acétate pH 4,5, DMF, 30°C, 15 h.

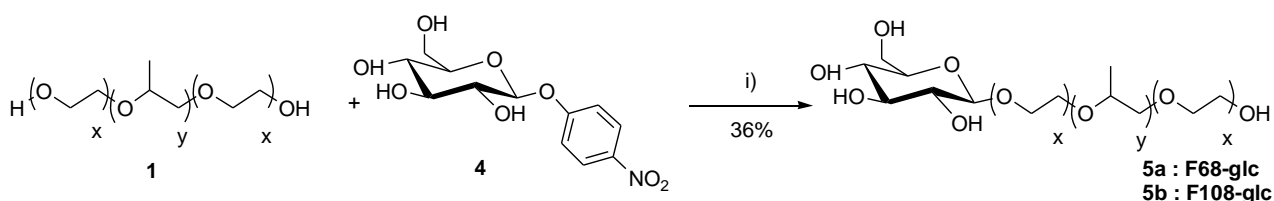
**Schéma 2: Synthèse enzymatique des stabilisateurs stériques galactosylés **3a** et **3b** par l'activité de transgalactosylation de la  $\beta$ -galactosidase d'*A. Oryzae*.**

La réaction de transglycosylation est cependant difficile à maîtriser car l'intermédiaire glycosyl-enzyme formé peut également réagir avec une molécule d'eau plutôt qu'avec l'accepteur et donner ainsi le produit d'hydrolyse (Spangenberg P *et al.*, 2000). La réaction de transglycosylation est donc limitée par la compétition

entre les deux nucléophiles (l'eau et le stabilisateur stérique). De plus, la réaction d'hydrolyse peut affecter les produits de transglycosylation **3a**, **3b** qui deviennent alors de nouveaux substrats pour l'enzyme. L'enzyme peut alors couper la liaison glycosidique formée conduisant ainsi à la libération du copolymère à blocs de départ (Chiffolleau-Giraud V *et al.*, 1999). Par conséquent, comme dans l'étude réalisée par André et al. (André C *et al.*, 2004), la réaction de galactosylation enzymatique a été suivie par contrôle cinétique pour déterminer le temps optimum de réaction permettant de greffer le maximum de résidus galactosyles. Cette synthèse enzymatique permet ici d'incorporer jusqu'à 25% de galactose sur les deux stabilisateurs stériques après 15h de réaction. Le taux de galactosylation obtenu est en accord avec celui déterminé dans l'étude préalable (André C *et al.*, 2004). En effet, la  $\beta$ -galactosidase d'*A. Oryzae* permet de fonctionnaliser dans les deux cas 25% des extrémités distales de l'accepteur.

### 2.1.2 Introduction d'un résidu glucosyle

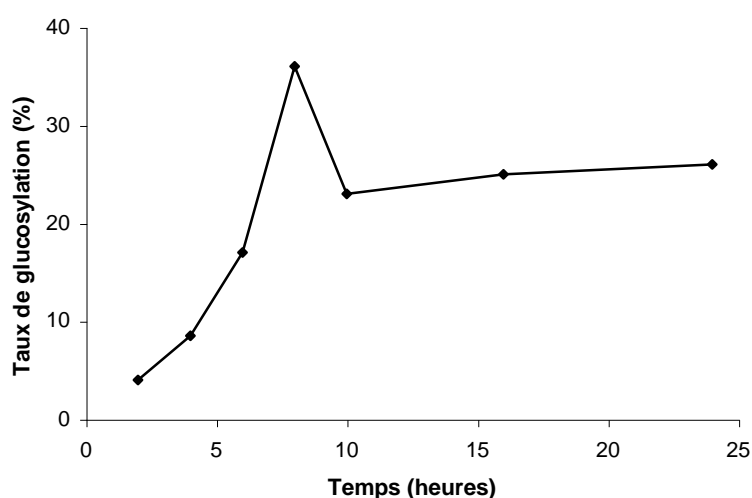
Le p-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside **4** a également été utilisé comme donneur afin de fonctionnaliser le F68 et le F108 par voie chimio-enzymatique (Schéma 3) en adaptant les conditions mises au point pour la galactosylation. Cette réaction de glycosylation repose sur l'activité de transglucosylation de la  $\beta$ -glucosidase d'Amande (*Prunus Dulcis*). La formation du produit de transglycosylation **5** est comme précédemment favorisée par l'utilisation d'un large excès de donneur **4** (50 éq par fonction alcool libre du stabilisateur stérique).



i)  $\beta$ -glucosidase d'Amande (*Prunus Dulcis*), tampon acétate pH 4,5, DMF, 30°C, 8h.

**Schéma 3: Synthèse enzymatique des stabilisateurs stériques glucosylés **5a** et **5b** par l'activité de transglucosylation de la  $\beta$ -glucosidase d'Amande.**

Le contrôle cinétique de la réaction de glucosylation enzymatique a également été réalisé pour déterminer le temps optimum permettant la formation majoritaire du produit de transglucosylation **5** (Figure 36). Pour cela, nous avons effectué des prélèvements du milieu réactionnel toutes les deux heures qui ont été soumis à un dosage à la glucose oxydase. Ce dosage permet d'évaluer le pourcentage de résidus glucosyles fixés aux extrémités des copolymères à blocs. Le mode d'action de la glucose oxydase repose sur l'oxydation de la position anomère du glucose et nécessite donc une coupure préalable de la liaison  $\beta$ -glycosidique des composés **5a** et **5b** par un traitement à l'acide trifluoroacétique.



**Figure 36:** *Cinétique de la glucosylation enzymatique catalysée par la  $\beta$ -glucosidase d'Amande.*

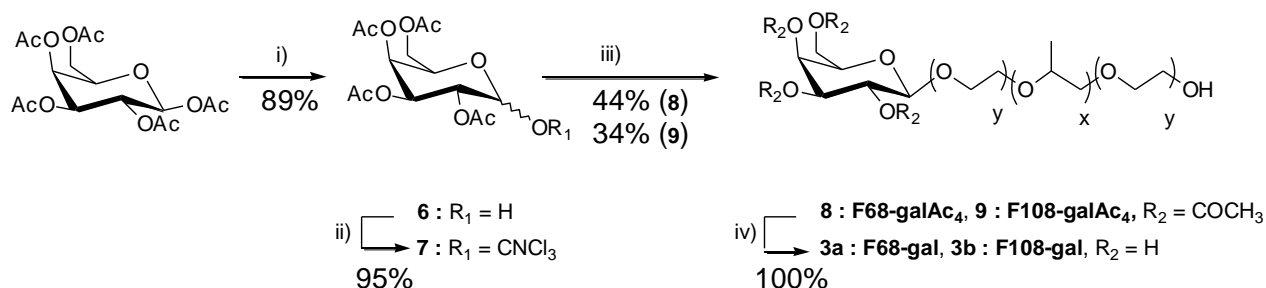
Cette étude cinétique montre que la réaction de glucosylation enzymatique permet de conduire à une incorporation maximale de 36% de D-glucose. Des taux de greffage similaires ont été obtenus sur les deux stabilisateurs stériques après 8h de réaction.

Ces synthèses chimio-enzymatiques présentent donc de nombreux avantages, de par leur simplicité et leur originalité, mais le mécanisme d'action de ces enzymes ne permet pas d'obtenir des taux d'incorporation des résidus glycosyles supérieurs à 36% du fait de la compétition entre les réactions de transglycosylation et d'hydrolyse. Aussi, afin d'améliorer les quantités de sucres greffés, une nouvelle méthode de couplage par voie chimique a été développée.

## 2.2 Synthèse chimique

### 2.2.1 Introduction d'un résidu galactosyle

Cette nouvelle voie de synthèse correspond à une méthode de greffage par voie chimique en 4 étapes (Schéma 4). La réaction de déprotection sélective de la position anomère du penta-O-acétyl-β-D-galactopyranoside par l'acétate d'hydrazine dans le DMF conduit au composé **6** avec un rendement de 89% (Zhao Y *et al.*, 1997). L'activation de la position anomère par action du trichloroacétonitrile dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pour donner le composé **7** (2,3,4,6-tetra-O-acétyl-1-O-trichloroacétimidoyl-α-D-galactopyranoside) avec un rendement de 95% (Dullenkopf W *et al.*, 1996). La réaction de glycosylation entre le saccharide activé **7** et le copolymère à blocs **1** est réalisée dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à température ambiante pendant 2h pour conduire à la formation des composés F68-galAc<sub>4</sub> **8** et F108-galAc<sub>4</sub> **9** avec un taux d'incorporation du D-galactose tétraacétylé de 44% et 34% respectivement. Enfin, la réaction de déprotection des groupements acétyles est effectuée par action du méthanoate de sodium à température ambiante pendant 2h pour conduire aux composés F68-gal **3a** et F108-gal **3b** présentant respectivement 44% et 34% de galactose à leurs extrémités distales.



i)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_3\text{COOH}$ , THF, tamis moléculaire 4Å, 4 h 30, TA ; ii)  $\text{Cl}_3\text{CCN}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , tamis moléculaire 4Å, 12 h, TA ; iii) **1**,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2 h, TA ; iv)  $\text{CH}_3\text{ONa}$ , MeOH, 2 h, TA.

#### Schéma 4: Synthèse chimique des stabilisateurs stériques galactosylés **3a** et **3b**.

Nous avons choisi le  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  comme acide de Lewis pour favoriser la configuration β de la liaison anomère entre le résidu galactosyle et le copolymère à blocs afin d'obtenir la même stéréochimie de couplage que lors de la réaction chimio-enzymatique. Le  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  délocalise les électrons de la fonction acétimide du composé **7** ce qui entraîne une charge δ<sup>+</sup> sur le carbone anomère du résidu galactosyle formant ainsi un pont oxonium avec le groupement acétyle équatorial situé en position 2 sur le cycle saccharidique. L'attaque du copolymère à blocs a

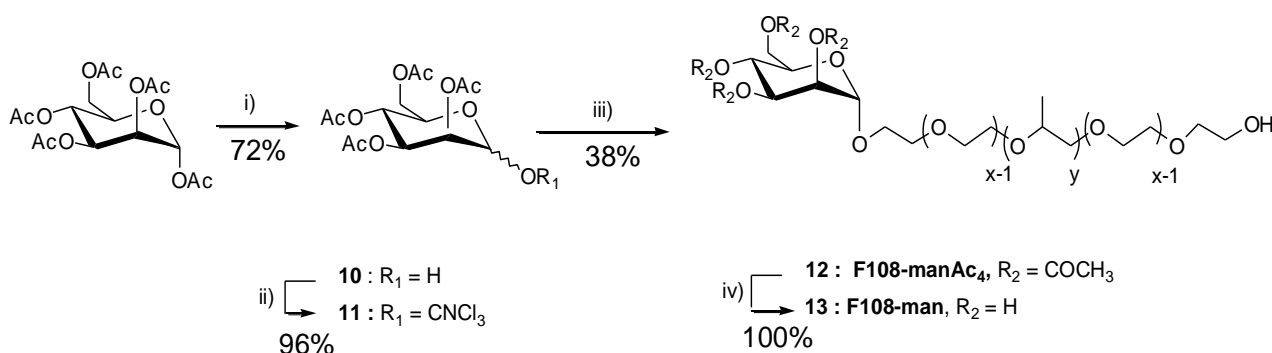
donc lieu au niveau de la face  $\alpha$  du résidu galactosyle induisant alors une liaison de stéréochimie  $\beta$  entre le résidu galactosyle et le copolymère à blocs.

La fonctionnalisation du F68 et du F108 par voie chimique, bien que présentant un nombre d'étapes plus important, a permis d'améliorer le taux d'incorporation des résidus galactosyles par rapport à la voie enzymatique.

### 2.2.2 Introduction d'un résidu mannosyle

Le schéma réactionnel mis au point pour la fonctionnalisation chimique des copolymères par le D-Galactose a été adapté au D-Mannose. Le F108 a ainsi été fonctionnalisé par mannosylation chimique (Schéma 5).

La première étape de déprotection sélective de la position anomère du penta-O-acétyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside conduit au composé **10** avec un rendement de 58%. La position anomère du composé **10** est activée comme précédemment par action du trichloroacétonitrile pour conduire à la formation du composé **11** avec un rendement de 89%. La réaction de glycosylation entre le saccharide **11** et le F108 permet d'isoler le F108-manAc<sub>4</sub> **12** présentant un taux d'incorporation du D-mannose tétraacétylé de 38%. Enfin, la réaction de déprotection des groupements acétyles conduit à l'obtention du composé F108-man **13** dont 38% des extrémités distales sont fonctionnalisées par des résidus mannosyles.



i)  $NH_2NH_2 \cdot CH_3COOH$ , THF, tamis moléculaire 4Å, 4 h 30, TA ; ii)  $Cl_3CCN$ ,  $K_2CO_3$ ,  $CH_2Cl_2$ , tamis moléculaire 4Å, 12 h, TA ; iii) F108,  $BF_3 \cdot Et_2O$ ,  $CH_2Cl_2$ , 2 h, TA ; iv)  $CH_3ONa$ , MeOH, 2 h, TA.

**Schéma 5: Mannosylation chimique du F108.**

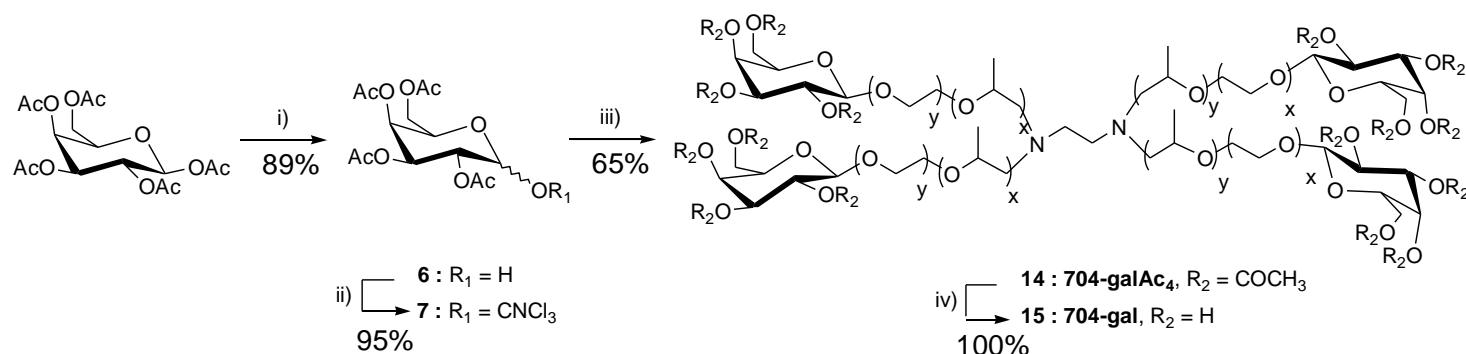
Le couplage entre le résidu mannosyle et le copolymères à blocs conduit à la formation d'une liaison anomère de configuration  $\alpha$  de par l'encombrement stérique engendré par le pont oxonium formé avec le groupement acétyle axial situé en position 2 sur le cycle saccharidique. Ainsi l'attaque du copolymère à blocs est préférentiellement dirigée vers la face  $\beta$  du résidu mannosyle formant ainsi une liaison glycosidique anomère de stéréochimie  $\alpha$ .

### **3. Fonctionnalisation chimique des copolymères à blocs ioniques**

Le 704 a été fonctionnalisé uniquement par voie chimique car la stratégie de synthèse enzymatique n'est pas adaptée à la fonctionnalisation des copolymères à blocs amphiphiles ioniques. En effet, aucune incorporation des résidus glycosyles n'a été mise en évidence pour le 704 utilisé comme accepteur.

#### **3.1 Introduction d'un résidu galactosyle**

Le 704 a été fonctionnalisé en 4 étapes par galactosylation chimique selon la même stratégie de synthèse que celle développée pour la glycosylation des copolymères à blocs non ioniques (Schéma 6) Les deux premières étapes de la réaction de galactosylation sont identiques à la synthèse précédente (Schéma 4) et conduisent aux mêmes composés **6** et **7** obtenus avec des rendements similaires de 89% et 95% respectivement. La réaction de glycosylation entre le saccharide **7** et le copolymère à blocs 704 est réalisée dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  à température ambiante pendant 2h pour conduire à la formation du composé 704-galAc<sub>4</sub> **14** avec un taux d'incorporation du D-galactose tétraacétylé de 65%. Enfin, la réaction de déprotection des groupements acétyles est effectuée par action du méthanoate de sodium à température ambiante pendant 2h pour former le composé 704-gal **15** présentant 65% de galactose à ses extrémités distales.



i)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_3\text{COOH}$ , THF, tamis moléculaire 4Å, 4 h 30, TA ; ii)  $\text{Cl}_3\text{CCN}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , tamis moléculaire 4Å, 12 h, TA ; iii) 704,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2 h, TA ; iv)  $\text{CH}_3\text{ONa}$ , MeOH, 2 h, TA.

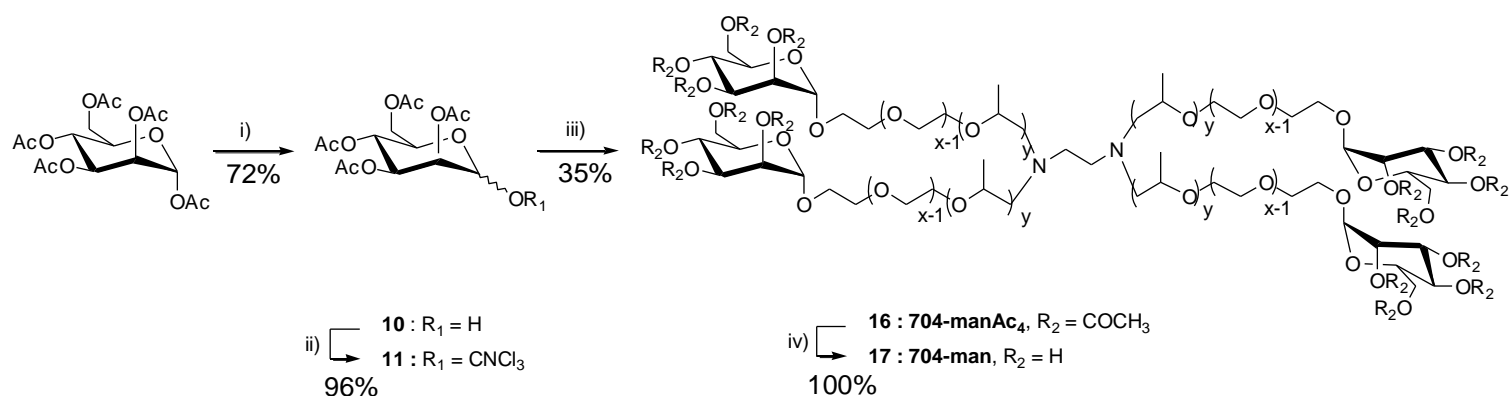
### Schéma 6: Galactosylation chimique du 704.

La réaction de galactosylation chimique du 704 a conduit à un taux d'incorporation des résidus galactosyles supérieur à celui obtenu lors de la fonctionnalisation des copolymères à blocs non ioniques. Cette augmentation du taux d'incorporation peut être expliquée par les conditions utilisées lors de la réaction de galactosylation. En effet lors de la réaction de galactosylation du F108, 10 équivalents du sucre activé du composé **7** sont introduits dans le milieu réactionnel ce qui correspond à 5 équivalents par fonction alcool terminale alors que pour le 704, ce sont 15 équivalents qui sont ajoutés soit 3,75 équivalents par fonction alcool. Le nombre d'équivalents de composé **7** disponible par fonction OH terminale est donc plus faible dans le cas du 704. Par contre, la concentration du composé **7** dans le milieu réactionnel ainsi que le nombre d'équivalents de  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  ajouté sont beaucoup plus élevés dans le cas de la réaction de galactosylation sur le 704. Par conséquent, il semblerait que la concentration en composé **7** ainsi que le volume de  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  introduit jouent un rôle important dans le greffage des résidus galactosyles aux extrémités distales des copolymères à blocs.

### 3.2 Introduction d'un résidu mannosyle

Le 704 a également été fonctionnalisé par mannosylation chimique (Schéma 7), en utilisant les conditions mises au point pour la réaction de mannosylation du F108. La réaction de déprotection sélective de la position anomère du penta-O-acétyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside par l'acétate d'hydrazine ainsi que la réaction d'activation de la position anomère par le trichloroacétonitrile conduisent à la formation des composés **10** et **11** avec les mêmes rendements que pour la mannosylation du F108. La

réaction de glycosylation entre le saccharide **11** et le 704 est ensuite réalisée dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  à température ambiante pendant 2h pour obtenir le composé 704-manAc<sub>4</sub> **16** présentant un taux d'incorporation du D-mannose tétraacétylé de 35%. Enfin, la réaction de déprotection des groupements acétyles est effectuée par action méthanoate de sodium à température ambiante pendant 2h pour former le composé 704-man **17** dont 35% des extrémités distales sont fonctionnalisées par des résidus mannosyles.



#### Schéma 7: Mannosylation chimique du 704.

Le taux d'incorporation des résidus mannosyles sur le 704 est plus faible que celui obtenu avec les résidus galactosyles. Par conséquent, la réaction de mannosylation peut encore être optimisée en jouant sur le nombre d'équivalents de  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  à introduire et/ou sur la concentration finale de composé **10** dans le milieu réactionnel.

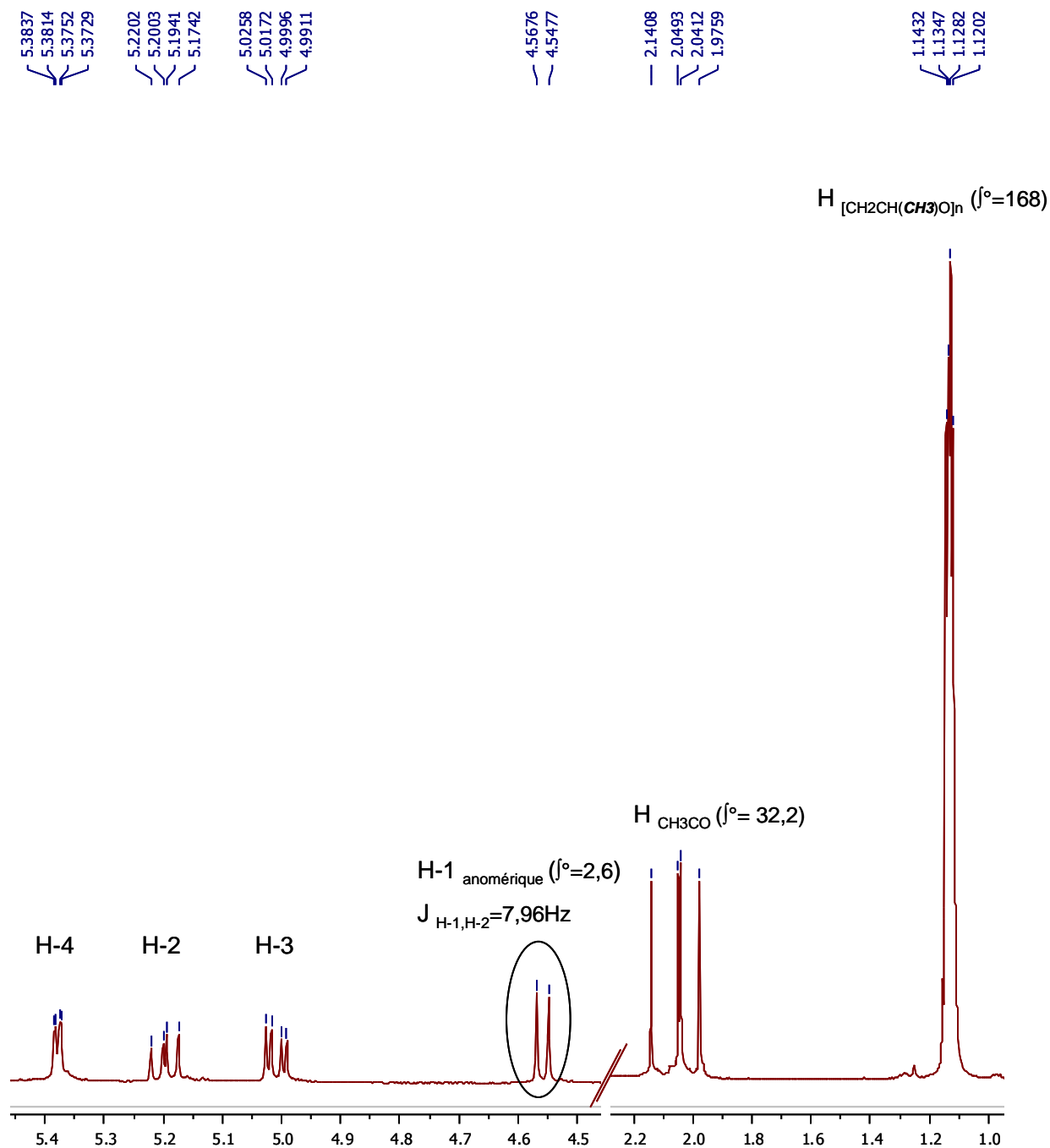
#### 4. Caractérisation chimique des copolymères à blocs fonctionnalisés

L'ensemble des stabilisateurs stériques fonctionnalisés ont été caractérisés par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . Le F68-gal **3a**, F108-gal **3b** ont également été analysés par chromatographie d'exclusion stérique (CES) pour évaluer les éventuelles modifications de la polydispersité des copolymères à blocs consécutives aux réactions de glycosylation.



#### **4.1. Taux d'incorporation des résidus glycosyles**

L'incorporation des résidus glycosyles aux extrémités distales de l'ensemble des stabilisateurs stériques fonctionnalisés a été déterminée par analyse RMN  $^1\text{H}$ . Par exemple dans le cas du 704-galAc<sub>4</sub> **14**, nous nous sommes intéressés aux protons caractéristiques du D-galactose tétraacétylé (H-1 anomère  $\delta=4,55$  ppm et CH<sub>3</sub> des acétyles  $\delta=2,14-1,97$  ppm) pour définir le pourcentage d'unités saccharidiques greffées aux extrémités distales des stabilisateurs stériques. L'intégration des signaux des protons des groupements méthyles des OP a été calibrée à 168 (nombre de protons théoriques des groupements CH<sub>3</sub> du 704) ( $\delta=1,14-1,02$  ppm) pour définir les intégrations des signaux du proton anomère et des protons des groupements acétyles afin de calculer le taux d'incorporation des résidus galactosyles sur le 704. Ces intégrations ont permis de déterminer qu'environ 65% des résidus galactosyles étaient couplées aux fonctions hydroxyles distales du 704 (Figure 37). La configuration de la liaison glycosidique entre le stabilisateur stérique et le résidu glycosyle a également été définie par RMN  $^1\text{H}$  grâce à la constante de couplage mesurée sur le signal (d) correspondant au proton anomère. Le proton anomère du résidu galactosyle greffé au 704-galAc<sub>4</sub> **14** présente une constante de couplage de 7,9 Hz (Figure 37). Cette dernière est caractéristique d'une liaison  $\beta$  qui est généralement comprise entre 7 et 8 Hz.



**Figure 37:** spectre RMN  $^1\text{H}$  du 704galAc<sub>4</sub> 14.  $\delta=4,55$  (d,  $J=7,9$  Hz, H-1 anomérique); 2,2-1,9 (4 x s, 4 x H<sub>CH<sub>3</sub>CO</sub>); 1,2-1,02 (m, 168H, H-[CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>n</sub>).

La même méthode a été appliquée pour l'ensemble des stabilisateurs stériques fonctionnalisés et a permis de déterminer le taux d'incorporation des différents résidus glycosyles en fonction de la voie de synthèse utilisée ainsi que la configuration de la liaison glycosidique entre le résidu saccharidique greffé et le stabilisateur stérique (Tableau 4).

		taux d'incorporation (%)	constante de couplage H-1 (Hz)
F68-gal, F68-galAc <sub>4</sub>	<b><u>3a, 8</u></b>	25*, 44	7,8
F108-gal, F108-galAc <sub>4</sub>	<b><u>3b, 9</u></b>	25*, 34	7,8
F68-glc	<b><u>5a</u></b>	36*	7,7
F108-glc	<b><u>5b</u></b>	36*	7,7
F108-man, F108-manAc <sub>4</sub>	<b><u>12, 13</u></b>	38	2,3
704-gal, 704-galAc <sub>4</sub>	<b><u>14, 15</u></b>	65	7,9
704-man, 704-manAc <sub>4</sub>	<b><u>16, 17</u></b>	35	2,3

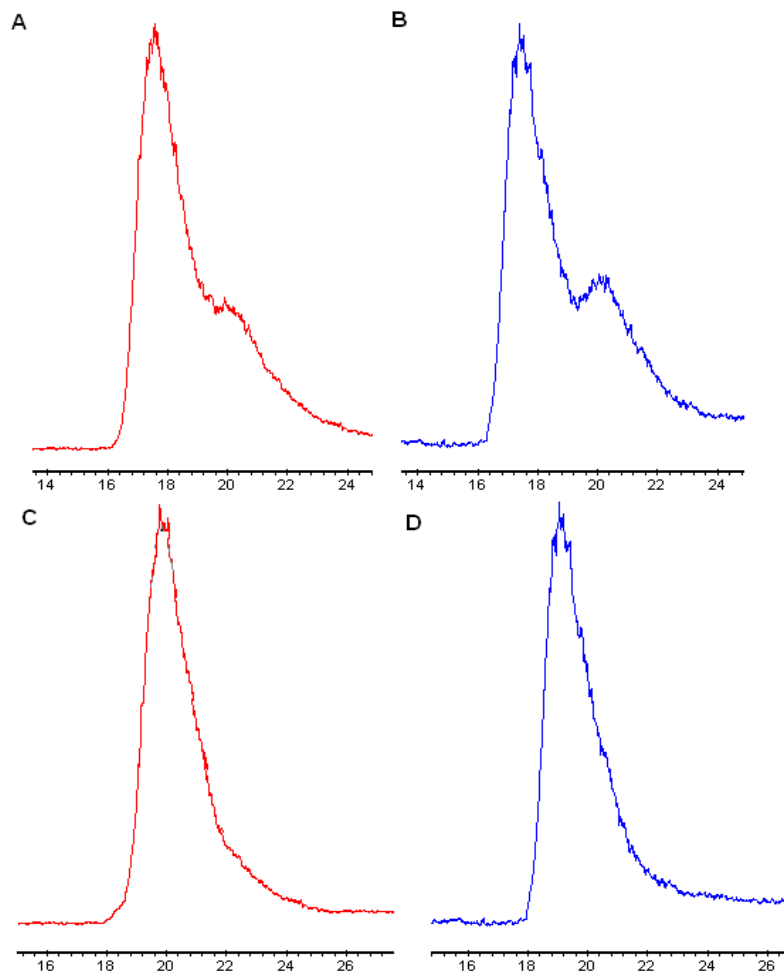
**Tableau 4: Taux d'incorporation des résidus glycosyles tétraacétylés (Ac<sub>4</sub>) et déacétylés ainsi que les constantes de couplage du H-1 anomère de l'ensemble des stabilisateurs stériques fonctionnalisés par voie enzymatique (\*) ou par voie chimique.**

Le Tableau 4 indique que l'ensemble des stabilisateurs stériques fonctionnalisés présentent un taux d'incorporation des résidus glycosyles compris entre 25 et 65% et ce, quel que soit le mode de synthèse choisi. La réaction de galactosylation des copolymères à blocs non ioniques par voie chimique conduit à des taux d'incorporation plus élevés (**8, 9**) que par voie enzymatique (**3a, 3b**). En effet, la synthèse enzymatique ne semble pas être la mieux adaptée pour la fonctionnalisation des stabilisateurs stériques car elle ne conduit qu'à de faibles taux d'incorporation des résidus saccharidiques sur les copolymères à blocs non ioniques voire même à aucune incorporation des résidus glycosyles sur le 704. Par contre, la réaction de galactosylation chimique a permis d'obtenir un taux d'incorporation des résidus galactosyles de 65% pour le 704 (**14**). De plus, les réactions de mannosylation chimique réalisées sur le F108 (**12**) ou le 704 (**16**) ont permis un taux d'incorporation des résidus mannosyles de 38 et 35% respectivement, bien que la réaction de mannosylation du 704 puisse encore être optimisée. Les stabilisateurs stériques galactosylés ou glucosylés (**3a, 8, 3b, 9, 5a, 5b, 14, 15**) présentent tous une constante de couplage d'environ 7,8 Hz qui est caractéristique d'une liaison  $\beta$  quelque soit la méthode de greffage utilisée. Les stabilisateurs stériques mannosylés **12, 13, 16 et 17** présentent eux, une constante de couplage de 2,3 Hz caractéristique d'un greffage du résidu glycosyle en  $\alpha$ .

#### **4.2. Analyses des stabilisateurs stériques fonctionnalisés par CES**

Nous avons également analysé par CES la polydispersité du F68-gal **3a** et du F108-gal **3b** en la comparant aux stabilisateurs stériques natifs (F68 et F108) (Figure

38). Les colonnes généralement utilisés en CES étant constituées de gels permanents provoquant des effets d'adsorption, nous avons utilisé comme éluant un mélange de cosolvants, eau/méthanol (50:50, v/v) qui permet de réduire ces effets (Erlandsson B *et al.*, 2003; Mao Y *et al.*, 2004). Afin de détecter les stabilisateurs stériques lors de l'analyse, nous avons utilisé un détecteur à diffusion de la lumière car ces copolymères à blocs n'absorbent pas dans le domaine de l'UV et le visible. La Figure 38 indique que le F68 et le F68-gal ainsi que le F108 et le F108-gal présentent des temps de rétention similaires de l'ordre de 16 et 18 min respectivement. Par conséquent, la similitude des chromatogrammes des stabilisateurs stériques parents ou galactosylés indique que la réaction de galactosylation ne perturbe pas leur profil natif donc le processus de synthèse n'a pas modifié la distribution des masses moléculaires du F68 et du F108.



**Figure 38: Chromatogrammes CES du F108 (A), F108-gal (B), F68 (C) et F68-gal (D).** Les stabilisateurs stériques galactosylés ou non galactosylés ont été préparés à une solution de 1g/l puis injectés sur une colonne TSK Gel Super SW 3000 (300 mm x 4,6 mm, 4  $\mu$ m) en utilisant comme éluant un mélange H<sub>2</sub>O/méthanol (50:50, v/v).

**Conclusion :**

La fonctionnalisation de l'ensemble des stabilisateurs stériques glycosylés par voie enzymatique ou chimique a conduit à un taux d'incorporation des résidus glycosyles compris entre 25 et 65%. La méthode de greffage par voie enzymatique présente de nombreux avantages, de par sa simplicité et son originalité, mais le mécanisme d'action des glycosidases utilisées ne permet pas d'obtenir des taux d'incorporation des résidus glycosyles supérieurs à 36%. De plus, cette voie de synthèse ne permet pas de fonctionnaliser le 704. En revanche, la synthèse chimique semble être mieux adaptée pour la fonctionnalisation des stabilisateurs stériques ioniques et non ioniques car elle conduit à des taux d'incorporation des résidus saccharidiques largement supérieurs pouvant atteindre 65% dans le cas du 704. Cependant, les réactions de glycosylation chimique peuvent encore être optimisées en jouant sur le nombre d'équivalents des réactifs ainsi que sur la concentration des composés activés (7, 10) disponibles par fonctions alcool distales des copolymères à blocs. Il est également important de noter que les réactions de galactosylation chimique ne perturbent pas le profil natif des copolymères à blocs, donc que le processus de synthèse ne modifie pas la distribution des masses moléculaires moyennes des copolymères à blocs.

## **PARTIE 2 : Conception d'un nouveau système synthétique multimodulaire galactosylé pour la délivrance spécifique d'acides nucléiques dans des hépatocytes primaires de rat.**

---

### ***A. Formulation du système multimodulaire***

La formulation du système multimodulaire repose sur la formation d'un cœur condensé d'ADN complexé à un lipide cationique à un rapport de charge proche de l'électroneutralité, qui est décoré par une couronne de stabilisateurs stériques galactosylés. Ce système a été réalisé dans le but de délivrer différents types d'acides nucléiques par endocytose spécifique via le récepteur aux asialoglycoprotéines (ASPGR) au sein des cellules hépatiques. Dans un premier temps, nous avons déterminé les conditions permettant l'électroneutralité du système multimodulaire qui est une condition essentielle à sa conception afin d'éviter toutes interactions non spécifiques avec les membranes cellulaires lors de la transfection, laissant ainsi les stabilisateurs stériques galactosylés assurer seuls, le ciblage naturel du ASPGR.

#### ***1. Lipides cationiques***

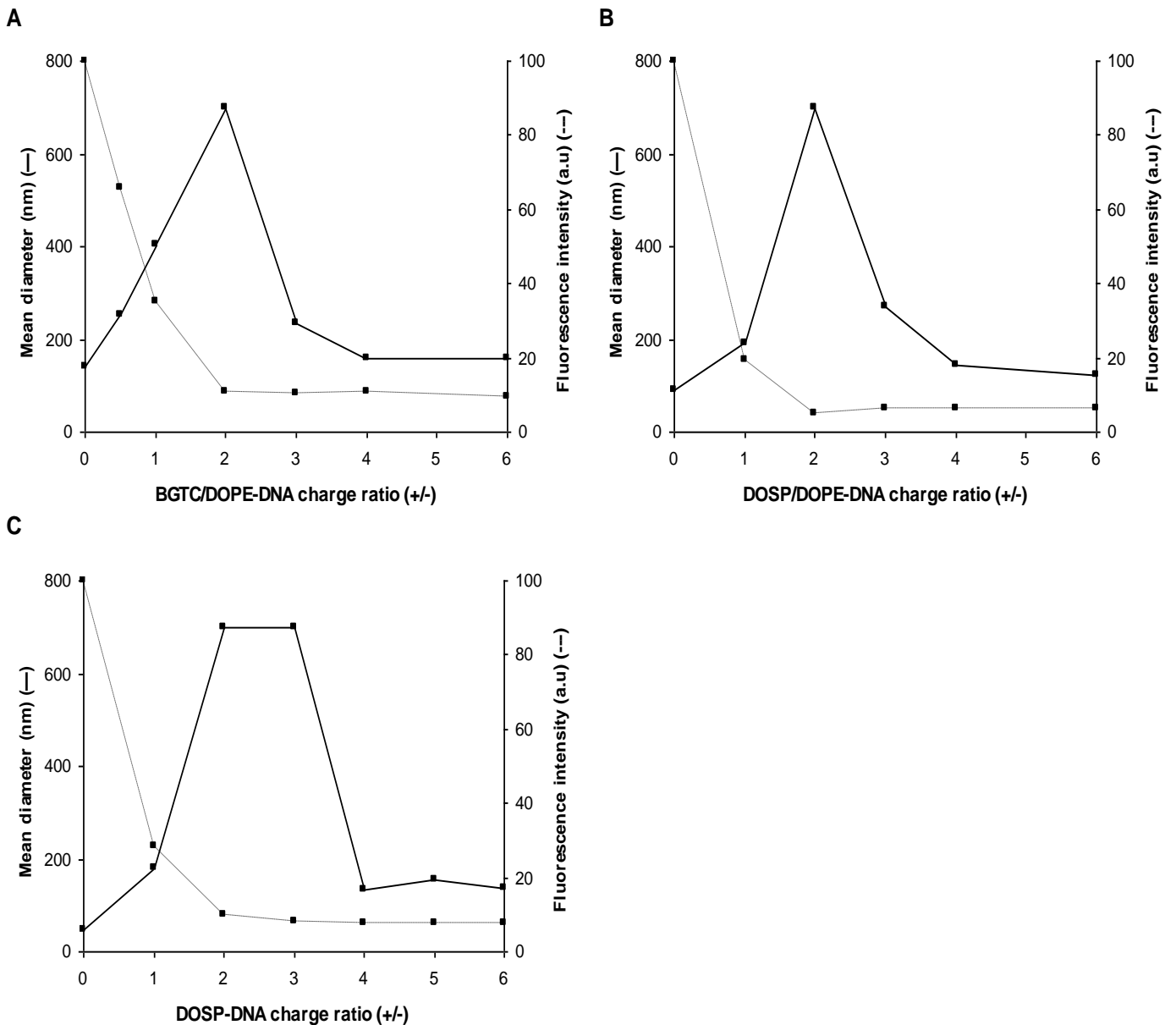
Dans un premier temps, le système multimodulaire a été mis au point par condensation de l'ADN avec deux lipides cationiques différents, le BGTC et la DOSP. Ils ont été préparés sous forme de liposomes en présence d'un co-lipide neutre, la DOPE, mais également sous forme de micelles pour la DOSP. Le BGTC est constitué d'une tête polaire composée de deux groupements guanidinium, portant chacun une charge positive, d'un bras espaceur et d'une chaîne hydrophobe correspondant à un groupement cholestérol. La DOSP appartient à la famille des dérivés lipidiques d'aminoglycosides qui ont fait l'objet d'une précédente étude au sein de notre équipe (Desigaux L *et al.*, 2007). Elle est composée d'une tête polaire constituée d'un aminoglycoside, la paromomycine portant quatre charges positives, lié à deux chaînes grasses insaturées par un bras succinyl.

#### ***2. Diagramme de stabilité colloïdale***

Nous avons tout d'abord caractérisé les propriétés physico-chimiques du cœur condensé d'ADN du système multimodulaire afin de déterminer les conditions de formulation assurant l'électroneutralité des différents complexes lipide cationique/ADN. Pour cela, nous avons mesuré la taille des lipoplexes par diffusion

quasi-élastique de la lumière en faisant varier le rapport de charge lipide cationique/ADN (Figure 39). En effet, le rapport de charge lipide cationique/ADN est un paramètre clé de la stabilisation colloïdale, il correspond au nombre de moles de charges positives apportées par le lipide cationique sur le nombre de moles de charges négatives apportées par les groupements phosphates de l'ADN. Nous avons également effectué des mesures de fluorescence pour vérifier la complexation des molécules d'ADN au sein des lipoplexes (Figure 39). Pour cela, nous avons utilisé le BET s'intercalant entre les paires de bases de l'ADN qui joue le rôle de sonde fluorescente. La fluorescence est exprimée en pourcentage à partir du niveau de fluorescence d'une solution d'acides nucléiques non complexés aux lipides cationiques obtenue en présence de BET.

La Figure 39 met en évidence pour l'ensemble des complexes lipide cationique/ADN, trois zones de stabilité colloïdale dépendantes du rapport de charge (+/-). Ces 3 zones A, B et C sont observées quelque soit le lipide utilisé et l'organisation supramoléculaire initiale. La zone A, pour des rapports de charge inférieurs à 2, présente des particules stables colloïdalement chargées négativement. La zone B est caractérisée par un rapport de charge proche de l'électroneutralité et elle est ici plus étendue lorsque les lipides cationiques ne sont pas associés à un co-lipide. En effet, elle est située à un rapport de charge de 2 pour les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN et DOSP/DOPE-ADN (Figure 39A et 39B) et à un rapport de charge compris entre 2 et 3 pour les lipoplexes DOSP-ADN (Figure 39C). Les particules formées dans la zone B possèdent une charge globale neutre mais en absence de répulsion électrostatique, ils sont instables colloïdalement, formant ainsi, de larges agrégats qui ne peuvent être mesurés par diffusion quasi-élastique de la lumière. Dans ces conditions, une valeur arbitraire de 700 nm a été attribuée pour ces lipoplexes instables colloïdalement. Enfin la zone C, pour des rapports de charge supérieurs à 3, est constituée de lipoplexes chargés positivement stables colloïdalement présentant un diamètre d'environ 180 nm de diamètre. De plus, la Figure 39 montre que l'intensité de fluorescence du BET en solution en présence des lipoplexes commence à diminuer pour les particules de la zone A puis tend vers des valeurs de fluorescence très faibles pour les objets de la zone B et C. Par conséquent, la totalité des molécules d'ADN sont complexées au sein des lipoplexes de la zone B et C alors que pour les particules de la zone A, une partie de l'ADN reste encore accessible au BET.



**Figure 39: Complexation de l'ADN et stabilité colloïdale des lipoplexes lipide cationique/ADN** formés à une concentration d'ADN de  $40\mu\text{g/mL}$ . Pour évaluer la stabilité colloïdale des lipoplexes et la complexation des acides nucléiques, des mesures par diffusion quasi-élastique de la lumière (traits pleins) et par fluorescence du BET en solution (traits discontinus) ont été réalisées, respectivement, après 20 min de complexation. Taille moyenne et niveau de fluorescence du BET des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN (A), DOSP/DOPE-ADN (B) et DOSP-ADN (C) en fonction du rapport de charge lipide cationique/ADN (+/-) compris entre 0 et 6.



Au vu de ces résultats, nous avons décidé de former les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN, DOSP/DOPE-ADN et DOSP-ADN à un rapport de charge commun de 2 pour constituer le cœur lipidique du système multimodulaire. Ce rapport de charge nous permet d'obtenir des objets neutres au sein desquels toutes les molécules d'ADN sont compactées. Cependant, dans ces conditions, les lipoplexes sont instables colloïdalement et nécessitent donc l'utilisation de stabilisateurs stériques. Ces stabilisateurs vont assurer la répulsion stérique entre les particules éliminant ainsi l'état d'agrégation des lipoplexes tout en conservant leur neutralité. Nous avons donc étudié la stabilisation colloïdale des lipoplexes issus de la zone B en présence de stabilisateurs stériques correspondant aux copolymères à blocs natifs ou galactosylés dont la synthèse a été préalablement décrite dans la partie 1.

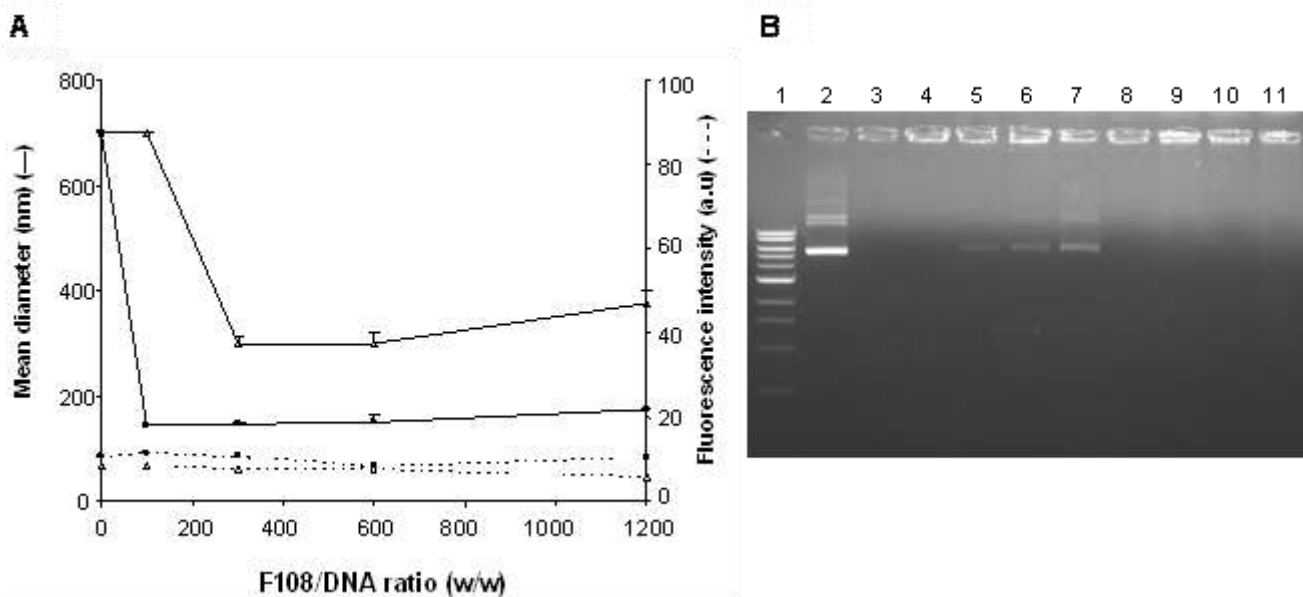
### **3. Stabilisation colloïdale des lipoplexes de la zone B**

#### **3.1. Stabilisation colloïdale des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN**

Les propriétés physico-chimiques des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2 ont été étudiées en présence de stabilisateurs stériques parents ou galactosylés correspondant au F108 et au F108-gal **3b**. La compréhension des propriétés physico-chimiques des lipoplexes associés aux stabilisateurs stériques est essentielle pour l'auto-assemblage du système multimodulaire. Par conséquent, nous avons caractérisé ces complexes BGTC/DOPE-ADN/F108 et BGTC/DOPE-ADN/F108-gal en étudiant l'influence du rapport stabilisateurs stériques/ADN (w/w) sur la stabilité colloïdale des lipoplexes par diffusion quasi-élastique de la lumière, par mesures de fluorescence du BET en solution ainsi que par électrophorèse sur gels d'agarose (Figure 40).

La Figure 40A représente le diamètre moyen des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN à un rapport de charge 2 en fonction du rapport F108-gal/ADN (w/w) et F108/ADN (w/w). En absence de stabilisateurs stériques, les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2 présentent un diamètre de 700 nm, comme nous l'avons observé précédemment (Figure 40A). Cependant, dès l'ajout du F108, c'est-à-dire au rapport F108/ADN (w/w) de 100, nous obtenons des complexes stables avec l'ADN d'environ 150 nm de diamètre. Le F108-gal conduit également à la formation de lipoplexes BGTC/DOPE-ADN stables colloïdalement avec un diamètre de 300nm mais qu'à partir du rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300. Ensuite, le niveau de fluorescence du BET en solution a été mesuré en présence des lipoplexes

BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108. La Figure 40A montre que le niveau de fluorescence est très bas aussi bien pour les lipoplexes galactosylés que non galactosylés, ce qui indique, que toutes les molécules d'ADN sont totalement incorporées au sein des particules BGTC/DOPE-ADN, stabilisées avec le F108-gal ou le F108. Pour confirmer ces résultats, des expériences d'électrophorèse sur gels d'agarose ont été réalisées sur l'ensemble des lipoplexes à différents rapports F108-gal/ADN (w/w) et F108/ADN (w/w). La Figure 40B démontre que les molécules d'ADN associées aux liposomes BGTC/DOPE en présence de F108 ne migrent pas dans le gel. Par contre, pour des rapports F108-gal/ADN élevés, les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal sont partiellement déstabilisés durant l'expérience d'électrophorèse, laissant ainsi quelques molécules d'ADN migrer dans le gel (Figure 40B) alors que ce phénomène n'était pas observé par les mesures de fluorescence du BET en solution.

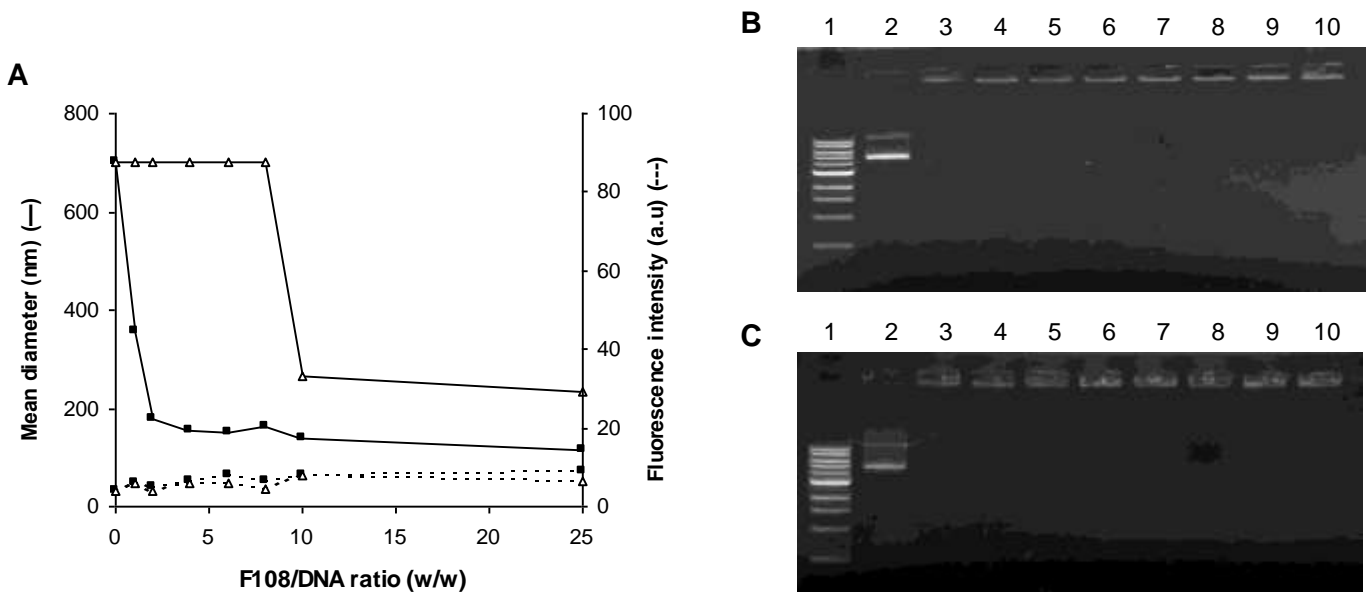


**Figure 40: Complexation de l'ADN et stabilisation colloïdale des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN en présence de F108-gal ou de F108.** Pour évaluer la stabilité colloïdale des lipoplexes et la complexation des acides nucléiques, des mesures par diffusion quasi-élastique de la lumière (traits pleins) et par fluorescence du BET en solution (traits discontinus) ont été réalisées, respectivement, après 20 min de complexation. (A) Taille moyenne et niveau de fluorescence du BET des lipoplexes en fonction du rapport F108-gal/ADN (w/w) ( $\Delta$ ) et F108/ADN (w/w) ratio ( $\blacksquare$ ). (B) Gel d'agarose des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal en fonction du rapport F108-gal/ADN (w/w) et des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108 en fonction du rapport F108/ADN (w/w). 1, 2 et 3 correspondent, respectivement, au marqueur de taille 1Kb, au plasmide nu, et aux lipoplexes agrégés BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2. Les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et BGTC/DOPE-ADN/F108 ont été déposés, respectivement, de 4 à 7 et de 8 à 11 en fonction du rapport F108-gal/ADN et F108/ADN (w/w) compris entre 100 et 1200.

Ces études de mesures de taille et de fluorescence ont permis de déterminer les rapports stabilisateurs stériques/ADN (w/w) nécessaires à la stabilisation colloïdale des particules BGTC/DOPE-ADN/F108 et BGTC/DOPE-ADN/F108-gal formant ainsi le premier système multimodulaire.

### 3.2. Stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN

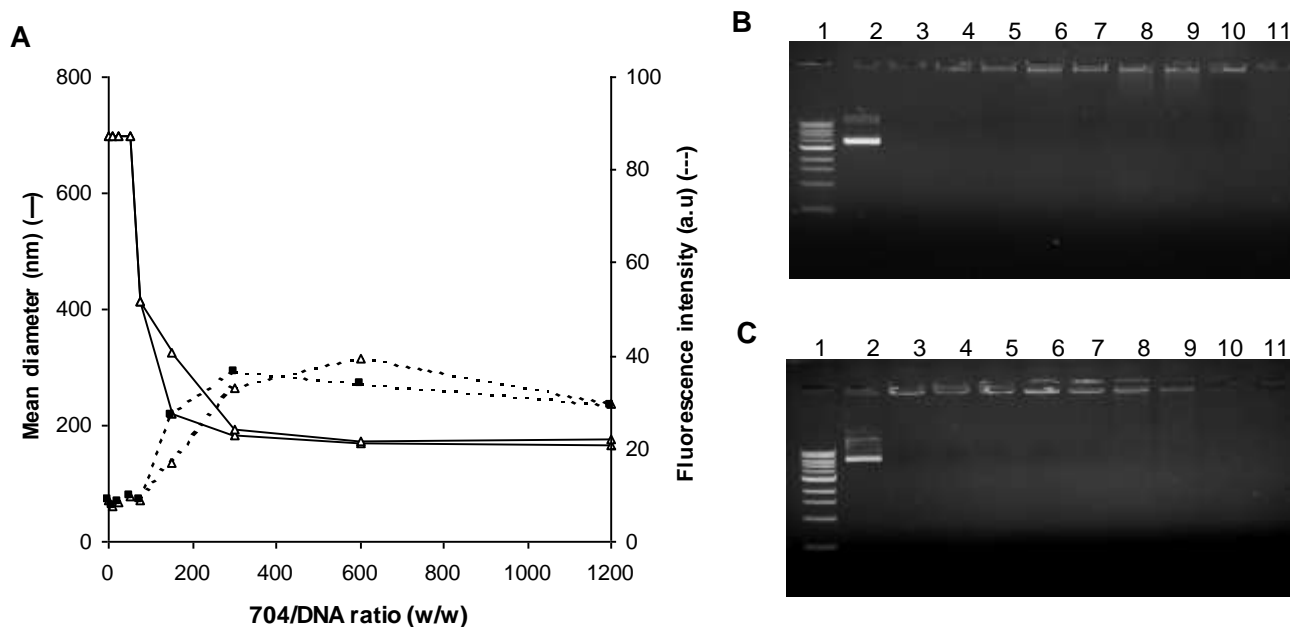
Les propriétés physico-chimiques des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2 ont également été étudiées en présence de F108 et de F108-gal **3b**. Comme précédemment, nous avons mesuré la taille des complexes DOSP/DOPE-ADN/F108 et DOSP/DOPE-ADN/F108-gal par diffusion quasi-élastique de la lumière en faisant varier le rapport stabilisateurs stériques/ADN (w/w) afin de déterminer les conditions optimales de stabilisation colloïdale. (Figure 41A). Des mesures de fluorescence du BET en solution ont également été effectuées en présence des lipoplexes galactosylés ou non galactosylés (Figure 41A)



**Figure 41: Complexation de l'ADN et stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN en présence de F108-gal ou de F108.** Mesures de taille (traits pleins) et mesures de fluorescence du BET en solution (traits discontinus) après 20 min de complexation. (A) Taille moyenne et niveau de fluorescence du BET des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN en fonction du rapport F108-gal/ADN (w/w) ( $\Delta$ ) et F108/ADN (w/w) ( $\blacksquare$ ). Gels d'agarose des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/F108-gal en fonction du rapport F108-gal/ADN (w/w) (B) et des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/F108 en fonction du rapport F108/ADN (w/w) (C). 1, 2 et 3 correspondent, respectivement, au marqueur de taille 1Kb, au plasmide nu, et aux lipoplexes agrégés DOSP/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2. Les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés en présence de F108-gal ou de F108 ont été déposés de 4 à 10 en fonction du rapport F108-gal/ADN (w/w) et F108/ADN (w/w) compris entre 1 et 25.

La Figure 41A représente le diamètre moyen des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN à un rapport de charge de 2 en fonction du rapport F108-gal/ADN (w/w) et F108/ADN (w/w). Comme pour les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN au rapport de charge de 2, en absence de stabilisateurs stériques, les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN sont instables colloïdalement, formant ainsi de larges agrégats d'environ 700nm. Cependant, nous obtenons une stabilisation colloïdale plus rapide des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN pour des rapports F108/ADN (w/w) et F108-gal/ADN (w/w) moins élevés, commençant respectivement à partir de 2 et de 10. En effet, la stabilisation colloïdale des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN au rapport de charge de 2 a nécessité des rapports F108-gal/ADN (w/w) et F108/ADN (w/w) beaucoup plus élevés que pour les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN au rapport de charge de 2. Toutefois, dans les deux cas nous pouvons remarquer que la stabilisation colloïdale des lipoplexes lipide cationique/ADN en présence de F108-gal est obtenue à des rapports F108-gal/ADN (w/w) toujours supérieurs à ceux nécessaires à la stabilisation des lipoplexes en présence de F108. De plus, la taille des lipoplexes galactosylés ou non galactosylés est similaire à celle mesurée pour les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et BGTC/DOPE-ADN/F108, avec respectivement 150 et 250 à 300 nm de diamètre. Le faible niveau de fluorescence détecté pour les lipoplexes galactosylés ou non galactosylés (Figure 41A) est corroboré par les expériences d'électrophorèse sur gels d'agarose puisqu'aucune molécule d'ADN ne migre dans les gels (Figure 41B et 41C). Par conséquent, les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/F108-gal sont des particules stables où l'ADN est totalement condensé au dérivé lipidique d'aminoglycosides. Grâce à ces études physico-chimiques, nous avons mis au point un nouveau système multimodulaire présentant un coeur condensé d'ADN différent.

Ces résultats encourageants nous ont poussés à évaluer la possibilité de créer de nouveaux systèmes multimodulaires en faisant varier la nature des stabilisateurs stériques. Par conséquent, nous avons décidé d'utiliser un stabilisateur stérique présentant des propriétés physico-chimiques différentes de celles du F108 ; le 704. Nous avons donc étudié, par diffusion quasi-élastique de la lumière la stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN au rapport de charge de 2 en présence du 704gal 15 et du 704 en faisant varier le rapport stabilisateurs stériques/ADN (w/w) (Figure 42A).



**Figure 42: Complexation de l'ADN et stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN en présence de 704-gal ou de 704.** Mesures de taille (traits pleins) et mesures de fluorescence du BET en solution (traits discontinus) après 20 min de complexation. (A) Taille moyenne et niveau de fluorescence du BET des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN en fonction du rapport 704-gal/ADN (w/w) ( $\Delta$ ) et 704/ADN (w/w) ratio ( $\blacksquare$ ). Gels d'agarose des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/704-gal (B) et DOSP/DOPE-ADN/704 (C). 1, 2 et 3 correspondent, respectivement, au marqueur de taille 1Kb, au plasmide nu, et aux lipoplexes agrégés DOSP/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2. Les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés en présence de 704-gal ou de 704 ont été déposés de 4 à 11 en fonction du rapport 704-gal/ADN (w/w) et 704/ADN (w/w) compris entre 10 et 1200.

Les mesures de taille ont été effectuées sur les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN à un rapport de charge de 2 en fonction du rapport 704-gal/ADN (w/w) et 704/ADN (w/w) (Figure 42A). La Figure 42A indique qu'en absence de 704-gal ou de 704 les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN au rapport de charge de 2 sont instables colloïdalement et forment de larges agrégats d'environ 700 nm. Cependant, la stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN obtenue après ajout du 704-gal et du 704 présente un profil différent de celui obtenu avec le F108-gal et le F108. En effet, nous obtenons une stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN pour des rapports 704-gal/ADN (w/w) et 704-ADN (w/w) de 300 et 150 respectivement. (Figure 42A). Comme pour les précédents lipoplexes galactosylés ou non galactosylés, nous avons étudié la complexation des molécules d'ADN par des mesures de fluorescence du BET en solution (Figure 42A). Le niveau de fluorescence détecté pour les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/704-gal et DOSP/DOPE-ADN/704 est supérieurs à ceux mesurés jusqu'à présent, ce qui laisserait penser qu'une partie des molécules d'ADN complexées au sein des lipoplexes serait

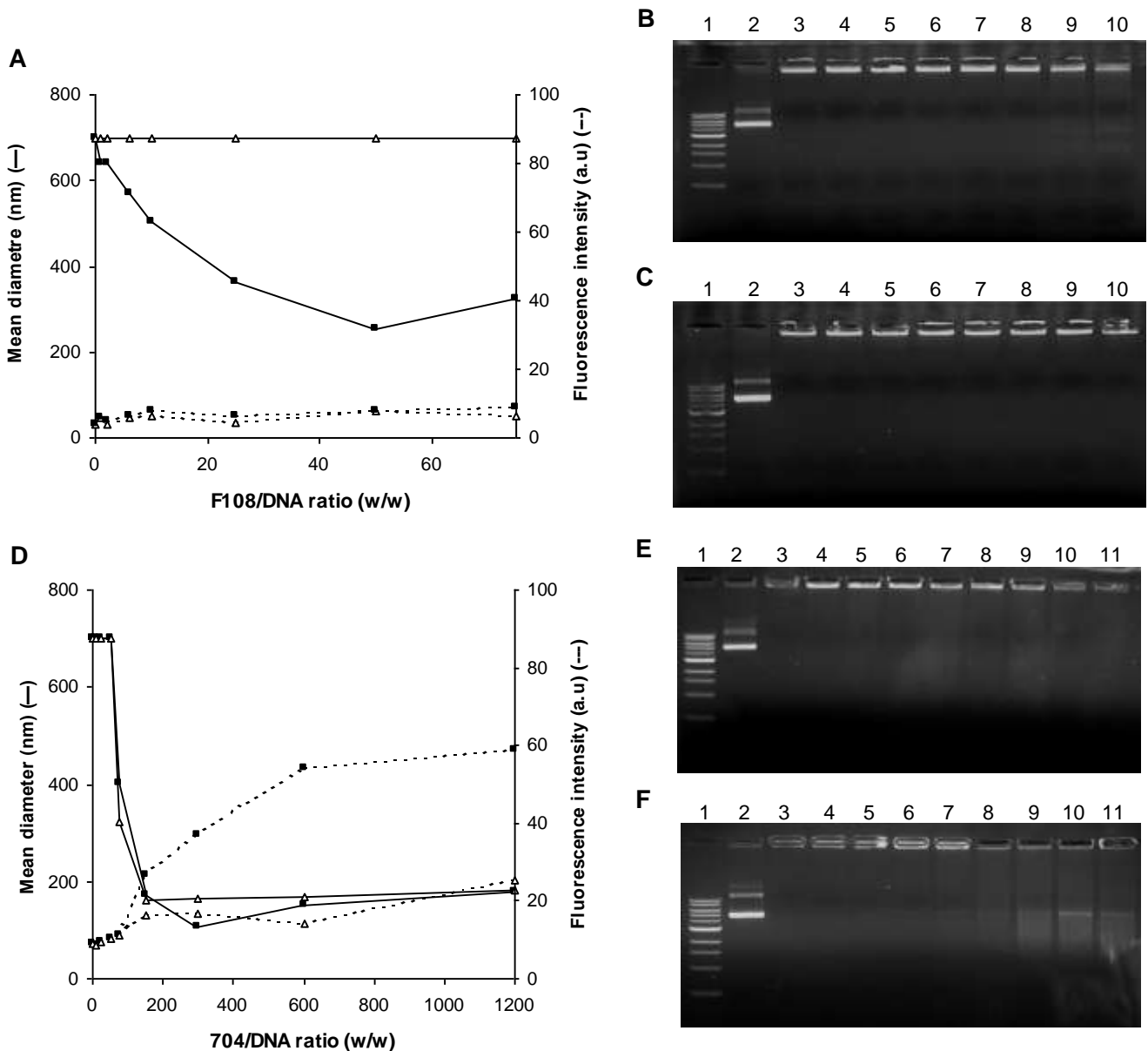
accessible au BET en solution (Figure 42A). Cependant, les expériences d'électrophorèse sur gels d'agarose montrent qu'aucune molécule d'ADN ne migre dans les gels que ce soit pour les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN stabilisés par le 704-gal ou le 704 (Figure 42B et 42C). Pourtant, les puits dans lesquels ont été déposés les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/704-gal et DOSP/DOPE-ADN/704 sont plus fluorescents que ceux contenant les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2, ce qui corrèle la légère augmentation du niveau de fluorescence mesuré. Par conséquent, bien qu'il n'y ait pas de relargage des molécules d'ADN dans les gels d'agarose, l'association entre les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN et le 704-gal ou le 704 est légèrement moins forte qu'avec les stabilisateurs stériques utilisés précédemment. Le 704 est un copolymère à blocs ionique chargé positivement de par le motif central éthylène diamine qui le constitue. Ainsi la légère dissociation des systèmes multimodulaires DOSP/DOPE-ADN/704-gal et DOSP/DOPE-ADN/704 observée dans le gel d'agarose après les expériences d'électrophorèse, pourrait s'expliquer par une faible répulsion électrostatique entre les charges positives portées par le lipide cationique et celle portée par le 704 galactosylé ou non galactosylé (Figure 42B et 42C). Néanmoins, nous avons conçu un second système multimodulaire composé d'un coeur d'ADN condensé par les lipoplexes DOSP/DOPE mais décoré avec des stabilisateurs stériques galactosylés de nature différente.

Au vu de ces résultats, nous avons décidé de former de nouveaux systèmes multimodulaires composés d'un coeur condensé d'ADN présentant une organisation supramoléculaire différente, en faisant varier la nature du lipide cationique. L'ADN est alors complexé directement avec le lipide cationique DOSP seul qui est sous forme de micelles, contrairement aux systèmes précédents où les lipides cationiques utilisés ont été préparés en présence d'un co-lipide neutre, la DOPE pour former des liposomes. Nous avons modifié la structure du coeur condensé d'ADN afin d'étudier son influence sur la formation du système multimodulaire en présence de différents stabilisateurs stériques.

### **3.3. Stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP-ADN**

Les propriétés physico-chimiques des lipoplexes DOSP-ADN formés au rapport de charge de 2 ont aussi été étudiées en présence de F108 et de F108-gal **3b** mais

également en présence de 704 et de 704-gal **15**. Comme pour les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN et DOSP/DOPE-ADN, des mesures de taille par diffusion quasi-élastique de la lumière ainsi que des mesures de fluorescence du BET en solution ont été effectuées sur les lipoplexes DOSP-ADN en présence des différents stabilisateurs stériques (Figure 43). Ces mesures ont été réalisées en faisant varier le rapport F108-gal/ADN (w/w) et F108/ADN (w/w) (Figure 43A) mais aussi le rapport 704-gal/ADN (w/w) et 704/ADN (w/w) (Figure 43D) afin de déterminer les conditions optimales de stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP-ADN formés au rapport de charge de 2. La Figure 43A représente le diamètre moyen des lipoplexes DOSP-ADN à un rapport de charge de 2 en fonction du rapport F108-gal/ADN (w/w) et F108/ADN (w/w). En absence de stabilisateurs stériques, les lipoplexes DOSP-ADN sont instables colloïdalement et forment de larges agrégats d'environ 700 nm comme nous l'avons précédemment observé (Figure 39C). L'ajout du F108 permet d'obtenir des complexes DOSP-ADN/F108 stables colloïdalement d'environ 300 nm de diamètre à partir du rapport F108/ADN (w/w) de 25 (Figure 43A). Cependant, le F108-gal ne parvient pas à stabiliser les lipoplexes DOSP-ADN au rapport de charge de 2 et ce même pour des rapports F108-gal/ADN (w/w) élevés (données non montrées). Les lipoplexes DOSP-ADN/F108-gal forment donc des agrégats d'environ 700 nm de diamètre (Figure 43A). Le niveau de fluorescence du BET en solution a également été mesuré en présence des lipoplexes DOSP-ADN/F108-gal et des lipoplexes DOSP-ADN/F108 en fonction des différents rapports F108-gal/ADN (w/w) et F108/ADN (w/w). La Figure 43A montre que le niveau de fluorescence est très bas pour les lipoplexes DOSP-ADN/F108, ce qui indique que toutes les molécules d'ADN sont totalement incorporées au sein des particules DOSP-ADN stabilisées avec le F108. Le niveau de fluorescence du BET en solution est également assez faible pour les lipoplexes DOSP-ADN au rapport de charge de 2 en présence du F108-gal, bien que ce dernier soit incapable d'assurer leur stabilisation colloïdale. Des expériences d'électrophorèse sur gels d'agarose ont permis de vérifier la complexation des molécules d'ADN au sein des lipoplexes DOSP-ADN/F108-gal et DOSP-ADN/F108 (Figure 43B et 43C). Les Figure 43B et 43C montrent que les molécules d'ADN associées aux micelles DOSP en présence de F108 et de F108-gal ne migrent pas dans le gel quelque soit le rapport F108/ADN (w/w) ou F108-gal/ADN (w/w).



**Figure 43: Complexation de l'ADN et stabilisation colloïdale des lipoplexes DOSP-ADN en présence de stabilisateurs stériques galactosylés ou non galactosylés.** Mesures de taille (traits pleins) et mesures de fluorescence du BET en solution (traits discontinus) après 20 min de complexation des lipoplexes DOSP-ADN en fonction du rapport F108-gal/ADN (w/w) ( $\Delta$ ) et F108/ADN (w/w) ( $\blacksquare$ ) (A) ainsi qu'en fonction du rapport 704-gal/ADN (w/w) ( $\Delta$ ) et 704/ADN (w/w) ( $\blacksquare$ ) (D). Gels d'agarose des lipoplexes DOSP-ADN/F108-gal (B), DOSP-ADN/F108 (C), DOSP-ADN/704-gal (E) et DOSP-ADN/704 (F). 1, 2 et 3 correspondent pour l'ensemble des gels, respectivement, au marqueur de taille 1Kb, au plasmide nu, et aux lipoplexes DOSP-ADN formés au rapport de charge de 2 (B, C, E et F). Les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés en présence de F108-gal (B) ou de F108 (C) ont été déposés de 4 à 10 en fonction du rapport F108-gal/ADN (w/w) et F108-ADN (w/w) compris entre 1 et 75. Les lipoplexes DOSP-ADN formés en présence de 704-gal (E) ou de 704 (F) ont été déposés de 4 à 11 en fonction du rapport 704-gal/ADN (w/w) et 704-ADN (w/w) compris entre 10 et 1200.



Au vu de ces résultats, le F108-gal ne semble pas être un stabilisateur stérique adapté à ce type de coeur condensé DOSP-ADN. Par contre le 704-gal et le 704 permettent de stabiliser colloïdalement les lipoplexes DOSP-ADN au rapport de charge de 2. En effet, après avoir effectué des mesures de taille par diffusion quasi-élastique de la lumière des lipoplexes DOSP-ADN au rapport de charge de 2 en fonction du rapport 704-gal/ADN (w/w) et 704/ADN (w/w), nous avons pu mettre en évidence que les lipoplexes DOSP-ADN sont stables colloïdalement à partir du rapport 704-gal/ADN (w/w) et 704/ADN (w/w) de 150 (Figure 43D). Les lipoplexes DOSP-ADN/704-gal et DOSP-ADN/704 présentent un diamètre de 170 et 150 nm respectivement.

Nous avons également mesuré le niveau de fluorescence du BET en solution en présence des lipoplexes DOSP-ADN/704-gal et DOSP-ADN/704 en fonction des rapports 704-gal/ADN (w/w) et 704/ADN (w/w) (Figure 43D). La Figure 43D montre que le niveau de fluorescence est faible pour les lipoplexes DOSP-ADN/704-gal, ce qui indique que toutes les molécules d'ADN sont totalement incorporées au sein des particules DOSP-ADN stabilisées avec le 704-gal. Cependant, les lipoplexes DOSP-ADN/704 sont caractérisés par un niveau de fluorescence élevé qui augmente avec le rapport 704/ADN (w/w) ce qui indique d'une partie des molécules d'ADN est accessible au BET pour des rapports 704/ADN (w/w) élevés (Figure 43D). Les expériences d'électrophorèse sur gels d'agarose corroborent ces résultats. Les lipoplexes DOSP-ADN/704 sont partiellement déstabilisés pour des rapports 704/ADN (w/w) supérieurs à 300, laissant ainsi quelques molécules d'ADN migrer dans le gel (Figure 43F). Seuls, les lipoplexes DOSP-ADN/704-gal permettent la complexation totale des molécules d'ADN puisqu'aucune migration n'est observée dans le gel (Figure 43E) ce qui est en accord avec les mesures de fluorescence du BET en solution (Figure 43D).

#### **4. Récapitulatif des systèmes multimodulaires formés**

Les études physico-chimiques ont tout d'abord permis de déterminer les rapports lipide cationique/ADN assurant l'électroneutralité des coeurs condensés d'ADN qui ont été formés à partir de plusieurs lipides cationiques présentant une organisation supramoléculaire initiale différente, c'est-à-dire sous forme de micelles ou de liposomes. Ensuite, nous avons pu définir les rapports stabilisateurs stériques/ADN

nécessaires à la stabilisation colloïdale des différents lipoplexes lipide cationique/ADN pour conduire à la formation de huit systèmes multimodulaires (Tableau 5).

	Taille (nm)	Niveau de fluorescence	Electrophorèse sur gels d'agarose
BGTC/DOPE-ADN/F108-gal	300	faible	déstabilisation des complexes, migration d'une partie des molécules d'ADN
BGTC/DOPE-ADN/F108	150		aucun relargage
DOSP/DOPE-ADN/F108-gal	250-300	très faible	aucune migration des molécules d'ADN
DOSP/DOPE-ADN/F108	150		
DOSP/DOPE-ADN/704-gal	300	augmente avec le rapport 704/ADN (w/w)	aucune migration mais puits fluorescents
DOSP/DOPE-ADN/704	150		
DOSP-ADN/F108-gal	700	faible	aucune migration des molécules d'ADN
DOSP-ADN/F108	300		
DOSP-ADN/704-gal	170	faible	aucune déstabilisation des complexes
DOSP-ADN/704	150	augmente avec le rapport 704/ADN (w/w)	migration des molécules d'ADN à partir du rapport 704/ADN (w/w) de 150

**Tableau 5 : Tableau récapitulatif des caractérisations physico-chimiques de l'ensemble des systèmes multimodulaires créés.**

Nous avons donc à notre disposition huit systèmes multimodulaires stables colloïdalement caractérisés par une forte compaction des molécules d'ADN (Tableau 5). Ils sont constitués de différents cœurs d'ADN condensé décorés par divers stabilisateurs stériques galactosylés ou non galactosylés. Ces systèmes correspondent aux lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal, BGTC/DOPE-ADN/F108, DOSP/DOPE-ADN/F108-gal, DOSP/DOPE-ADN/F108, DOSP/DOPE-ADN/704-gal, DOSP/DOPE-ADN/704, DOSP-ADN/704-gal et DOSP-ADN/704.

Le système multimodulaire BGTC/DOPE-ADN/F108-gal est le seul à être déstabilisé lors des expériences d'électrophorèse alors que le niveau de fluorescence du BET en solution en présence des lipoplexes galactosylés ou non galactosylés est faible. Nous avons donc décidé de poursuivre cette étude sur ce système multimodulaire afin de déterminer l'effet des différents paramètres nécessaires à sa formation, sur le phénomène de relargage des molécules d'ADN dans le gel d'agarose. Pour cela, nous avons fait varier dans un premier temps, le rapport de charge lipide

cationique/ADN pour étudier son influence sur la complexation des molécules d'ADN au sein des lipoplexes. De plus, le BGTC/DOPE est un lipide cationique dont l'efficacité *in vitro* pour vectoriser de l'ADN est bien connue et décrite dans différents articles scientifiques (Oudrhiri N *et al.*, 1997b; Pitard B *et al.*, 1999; Vigneron JP *et al.*, 1996).

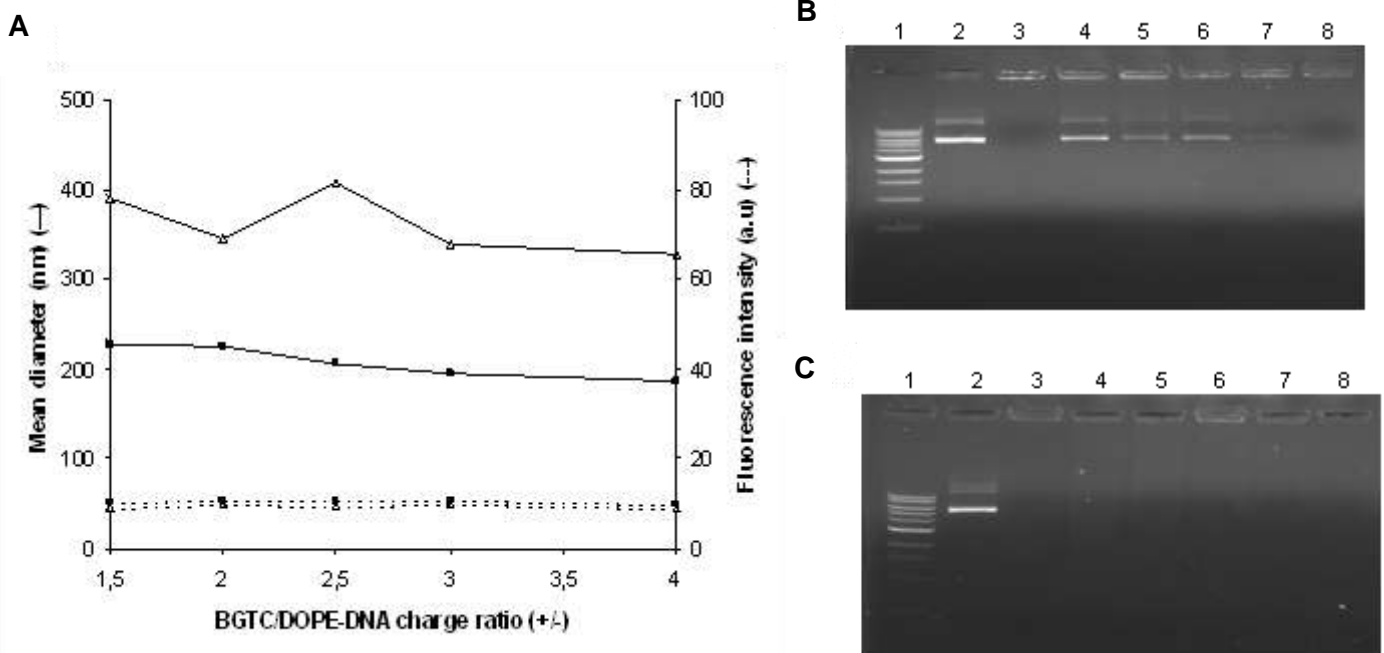
### **5. Influence du rapport de charge BGTC/DOPE-ADN**

Nous avons ensuite étudié l'influence du rapport de charge BGTC/DOPE-ADN sur la taille des particules ainsi que sur la complexation de l'ADN en présence de F108-gal ou de F108 un rapport F108/ADN (w/w) fixe de 300. La Figure 44 montre que quelque soit le rapport de charge BGTC/DOPE-ADN, nous obtenons des objets stables colloïdalement de l'ordre de 350 nm en présence de F108-gal et de 220 nm en présence de F108. Cette figure met également en évidence la forte complexation de l'ADN au sein des lipoplexes galactosylés ou non galactosylés puisque le niveau de fluorescence du BET en solution est peu élevé quelque soit le rapport de charge BGTC/DOPE-ADN impliqué. Cependant, les gels d'agarose (Figure 44B et 44C) indiquent que seuls les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal sont partiellement déstabilisés durant l'électrophorèse et cela seulement pour des rapports de charge BGTC/DOPE-ADN compris entre 1,5 et 3 (Figure 44B) alors que ce phénomène n'est pas observé en présence de BET en solution. Ces résultats corroborent ceux obtenus lors de la première étude physico-chimique des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2 et au rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300 (Figure 40B).

La Figure 44 indique que l'augmentation du rapport de charge BGTC/DOPE-ADN modifie la complexation des molécules d'ADN au sein des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal. En effet plus le rapport de charge BGTC/DOPE-ADN augmente, moins les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal sont déstabilisés lors de l'électrophorèse. Au rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 4, aucune molécule d'ADN ne migre dans le gel d'agarose, ce qui signifie que les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal sont moins labiles à ce rapport de charge.

Par conséquent, le phénomène de déstabilisation des lipoplexes galactosylés sous l'action d'un champ électrique semble dépendre du rapport de charge lipide cationique/ADN. Les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés à un rapport de charge

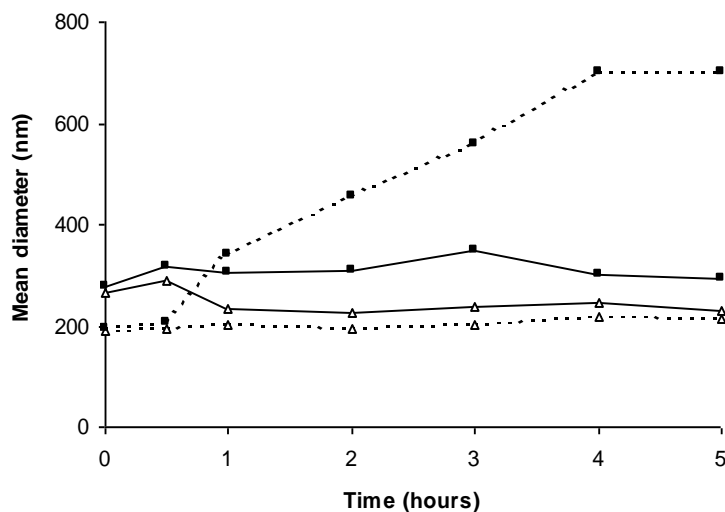
supérieur à 3 sont caractéristiques de la zone C, ce qui correspond à des particules chargées positivement déjà stables colloïdalement (Figure 39A) et donc ne nécessitant plus la présence de stabilisateurs stériques. Par conséquent, les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal formés à ces rapports de charge ne sont plus adaptés à une transfection par endocytose spécifique récepteur-dépendant. De plus, les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal formés au rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2,5 présentent une taille d'environ 430 nm contrairement aux autres lipoplexes mesurant 300 nm. Quant aux lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal formés à un rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 1,5, ils sont déstabilisés plus facilement dans le gel d'agarose que les autres lipoplexes, entraînant ainsi une plus grande quantité d'ADN migrant dans le gel. Nous avons donc choisi de garder la formulation du système multimodulaire BGTC/DOPE-ADN/F108-gal à un rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2 pour continuer les études de caractérisation physico-chimique.



**Figure 44: Influence du rapport de charge BGTC/DOPE-ADN.** (A) Stabilité colloïdale (traits pleins) et complexation de l'ADN (traits discontinus) des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN en présence de F108-gal ( $\Delta$ ) et de F108 ( $\blacksquare$ ) en fonction du rapport de charge BGTC/DOPE-ADN. Electrophorèse sur gels d'agarose des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal à un rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300 (B) et des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108 à un rapport F108/ADN (w/w) de 300 en fonction de différents rapports de charge BGTC/DOPE-ADN (C). 1, 2 et 3 correspondent, respectivement, au marqueur de taille 1Kb, au plasmide nu, et aux lipoplexes BGTC/DOPE-ADN à un rapport de charge de 2. 4 à 8 correspondent, respectivement, aux lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/stabilisateurs stériques aux rapports de charge BGTC/DOPE-ADN de 1,5, 2, 2,5, 3 et 4.

### 6. Influence du milieu de transfection *in vitro*

Le système BGTC/DOPE-ADN/F108-gal étant destiné à la transfection *in vitro* d'hépatocytes primaires pour cibler spécifiquement le ASPGR présent à la surface de ces cellules, nous avons vérifié la stabilité colloïdale des lipoplexes galactosylés en présence du milieu de culture des hépatocytes par diffusion quasi-élastique de la lumière. En effet, les composants chargés du milieu de culture peuvent altérer la taille des lipoplexes préformés, avant même, qu'une transfection efficace n'ait lieu (Turek J *et al.*, 2000). Par conséquent, nous avons évalué la taille des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal préparés au rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2 et au rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300 ainsi que celle des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN au rapport de charge de 4 en présence du milieu de culture des hépatocytes primaires et d'une solution de NaCl à 150 mM (Figure 45). Les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 4 servent de contrôle car ces lipoplexes issus de la zone C (Figure 39A) sont chargés positivement et seront internalisés dans les hépatocytes primaires par endocytose non spécifique via les interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires chargées négativement. La taille des lipoplexes a été mesurée toutes les heures.



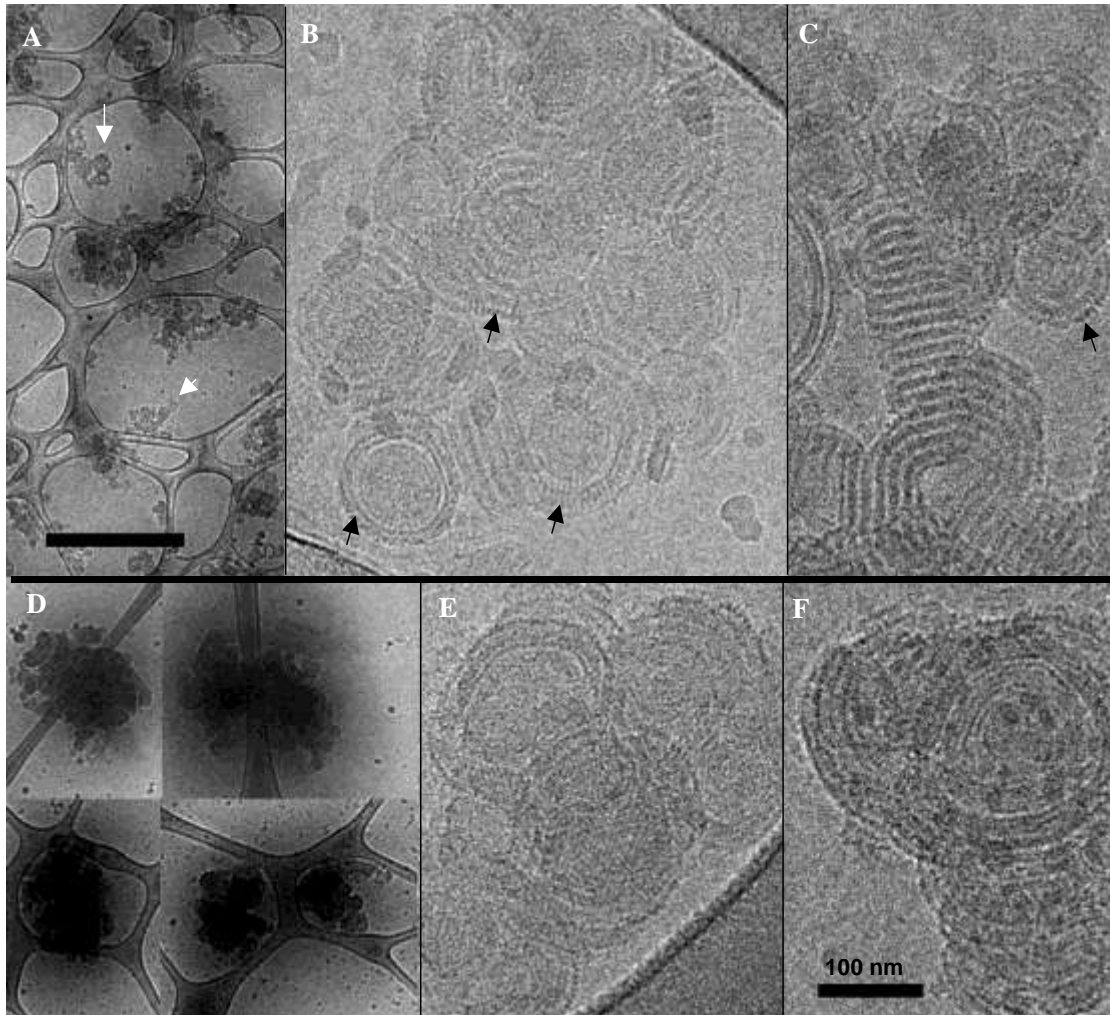
**Figure 45: Stabilité colloïdale des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal en présence de milieu de transfection.** Analyses par diffusion quasi-élastique de la lumière des lipoplexes chargés positivement BGTC/DOPE-ADN (traits discontinus) en présence du milieu de transfection des hépatocytes primaires (■) ou en présence d'une solution de NaCl à 150 mM (Δ). Mesures similaires pour les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal (traits pleins) formés au rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2 et au rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300 en présence du milieu de transfection des hépatocytes primaires (■) ou en présence de NaCl (Δ).

Une heure après l'addition du milieu de transfection la taille des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN au rapport de charge de 4 commence à augmenter jusqu'à former de larges agrégats (Figure 45). Par contre, les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal sont capables de maintenir leur taille de 300 nm de diamètre aussi bien en solution saline qu'au contact du milieu de transfection. Par conséquent, lors de la transfection la taille des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal restera inchangée permettant ainsi au système d'être internalisé par la voie d'endocytose récepteur-dépendant dont la limite d'internalisation des particules se situe entre 200 et 300 nm.

### **7. Morphologie du système BGTC/DOPE-ADN/stabilisateurs stériques**

Nous avons finalement complété l'analyse physico-chimique des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et BGTC/DOPE-ADN/F108 formés au rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2 et au rapport F108/ADN (w/w) de 300 en visualisant leur morphologie par cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM) (Figure 46). En présence de F108, à un rapport F108/ADN de 300, les lipoplexes présentent une taille comprise entre 50 et 300 nm et sont principalement composés de structures sphériques qui se rassemblent en grappes (flèches blanches). Ces structures sphériques correspondent à des liposomes entourés de molécules d'ADN (Figure 46B). L'espacement régulier de 2,5 nm à la surface des liposomes correspond à l'assemblage des molécules d'ADN (flèches noires). Ces lipoplexes contiennent une structure répétitive typique, composée de bicouches ADN/lipide résultant d'une forte restructuration des liposomes de départ, visible au niveau de la Figure 46C. Les lipoplexes formés en présence de F108-gal, à un rapport F108-gal/ADN de 300, apparaissent de plus grande taille, mais également plus denses, que ceux obtenus avec le F108, comme nous avons pu déjà le remarquer lors des expériences de mesures de taille (Figure 40A). La taille de ces objets variant entre 50 et 500nm (Figure 46D), seule la surface des lipoplexes a pu être correctement visualisée en cryo-TEM lors des agrandissements (Figure 46E et 46F). Les lipoplexes galactosylés sont également caractérisés par une structure répétitive correspondant aux molécules d'ADN prises en sandwich entre les bicouches lipidiques qui a nécessité un réarrangement significatif des liposomes de départ. Bien que leurs tailles soient globalement différentes, les lipoplexes formés en présence de

F108 ou de F108-gal présentent une organisation similaire. Par conséquent, les stabilisateurs stériques semblent ne pas avoir d'influence apparente sur les interactions BGTC/DOPE-ADN.



**Figure 46: Visualisation des lipoplexes multimodulaires par cryo-TEM.** (A) Visualisation des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108 à faible agrandissement. (B, C) Agrandissement des lipoplexes montrant des assemblages complexes où l'ADN est pris en sandwich entre les bicouches lipidiques (flèches noires). (D) Vues d'ensemble des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal mettant en évidence des assemblages denses et de grandes tailles. (E, F) Agrandissement d'une petite partie d'ADN condensé. Barres d'échelle 1  $\mu\text{m}$  (A, D) et 100 nm (B, C, E, F).

Nous avons ensuite étudié l'efficacité des différents systèmes multimodulaires galactosylés mis au point durant ces études physico-chimiques, à transfecter *in vitro* des hépatocytes primaires de rat par ciblage spécifique du ASPGR présent à leur surface, dont le ligand naturel correspond à des glycoprotéines portant un résidu galactosyl terminal.

## ***B. Efficacité de transfection in vitro des systèmes multimodulaires galactosylés***

L'efficacité de transfection de trois systèmes multimodulaires différents a été évaluée dans des hépatocytes primaires de rat. Chacun des trois systèmes multimodulaires testés ont été conçus avec des lipides cationiques ainsi que des stabilisateurs stériques de natures différentes. Ces systèmes correspondent aux lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal, DOSP/DOPE-ADN/F108-gal et DOSP-ADN/704-gal.

### ***1. Transfection des hépatocytes primaires in vitro***

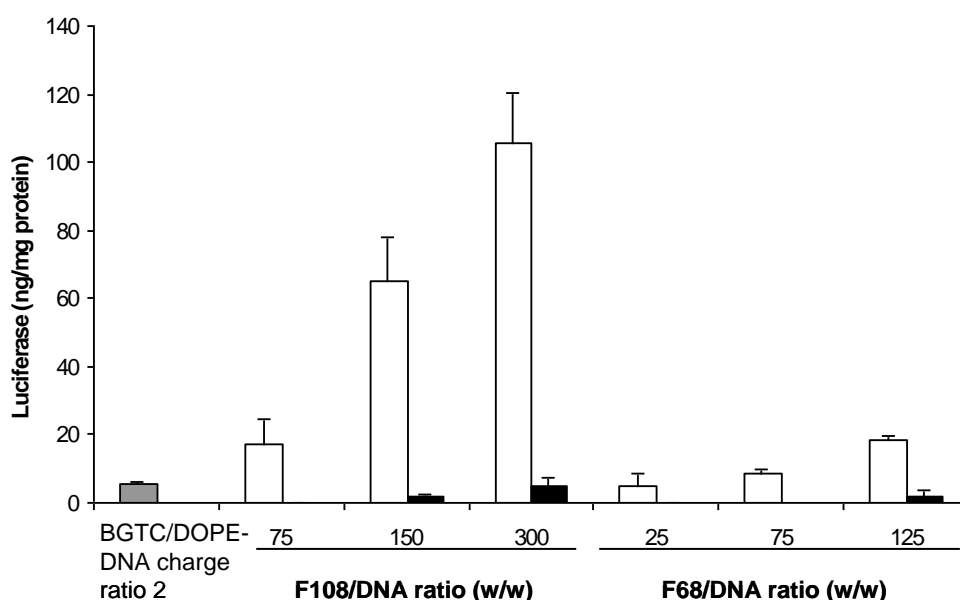
#### ***1.1. Efficacité de transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal***

Le système multimodulaire BGTC/DOPE-ADN/F108-gal est constitué d'un coeur lipidique composé de liposomes BGTC/DOPE complexés à de l'ADN à un rapport de charge (+/-) de 2, proche de l'électroneutralité donc instables colloïdalement, auquel est ajouté le F108-gal **3b** à différents rapports F108-gal/ADN (w/w) pour assurer la stabilité colloïdale du système ainsi que le ciblage du ASPGR. Ce système a été formé pour une concentration d'ADN de 40 µg/mL. Des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108 ont également été préparés dans les mêmes conditions que les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal afin de les utiliser comme contrôle négatif lors de la transfection des hépatocytes primaires. Ces lipoplexes n'étant pas équipés de galactose, ils devraient être incapables de conduire à la transfection spécifique des hépatocytes via une endocytose récepteur-dépendant puisqu'ils ne seraient pas reconnus par le ASPGR. Nous avons aussi fait varier la longueur du stabilisateur stérique en utilisant le F68-gal **3a** qui présente une masse moléculaire inférieure à celle du F108-gal afin d'étudier son influence sur le ciblage du ASPGR.

Nous avons donc évalué l'efficacité de transfection *in vitro* des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal, BGTC/DOPE-ADN/F108, BGTC/DOPE-ADN/F68-gal et BGTC/DOPE-ADN/F68 sur des hépatocytes primaires de rat en fonction du rapport stabilisateurs stériques/ADN (w/w) (Figure 47). La Figure 47 montre que les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formulés avec le F108-gal conduisent à une nette augmentation de l'expression du gène rapporteur et ce d'autant plus, lorsque le



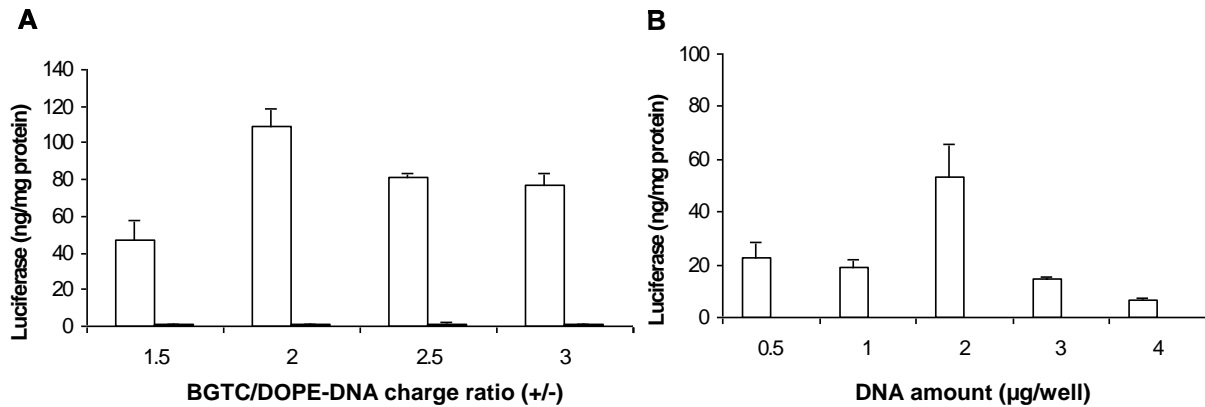
rapport F108-gal/ADN (w/w) augmente. La même tendance est observée avec le F68-gal, bien que l'augmentation de l'expression du transgène soit moins spectaculaire. Quant aux lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés en absence ou en présence de F108 ou de F68, ils ne permettent pas de transférer de manière significative les hépatocytes primaires. Par conséquent, ces résultats semblent indiquer que, non seulement, les particules équipées de galactose conduiraient à une transfection spécifique des hépatocytes, mais également, que la longueur du stabilisateur stérique jouerait un rôle important dans l'accessibilité du ligand au récepteur et donc dans le processus d'internalisation de la particule.



**Figure 47: Efficacité de transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2 en présence de stabilisateurs stériques de nature chimique différente.** L'activité luciférase est mesurée 24 heures après la transfection des hépatocytes primaires. Les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/stabilisateurs stériques galactosylés (barres blanches) et non galactosylés (barres noires) ont été préparés à différents rapports stabilisateurs stériques/ADN (w/w) compris entre 25 et 300.

Forts de ces résultats, nous avons décidé d'optimiser le système synthétique en réalisant des expériences complémentaires sur la base de l'assemblage BGTC/DOPE-ADN/F108-gal au rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300. Nous avons tout d'abord fait varier le rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 1,5 à 3 (Figure 48A) car nous avons déjà démontré que pour ces rapports de charge les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal présentent un comportement physico-chimique différent

(Figure 44A et 44C). La quantité d'ADN compacté au sein des particules BGTC/DOPE-ADN/F108-gal formés à un rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2 et à un rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300 a également été étudiée pour déterminer son influence sur la transfection (Figure 48B).



**Figure 48: Efficacité biologique des lipoplexes galactosylés en fonction du rapport de charge (+/-) et de la quantité d'ADN.** (A) Les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN ont été préparés à différents rapports de charge mais à une concentration identique d'ADN de 40 µg/mL puis ils ont été formulés soit avec le F108-gal (barres blanches) soit avec le F108 (barres noires) à un rapport stabilisateurs stériques/ADN (w/w) de 300. (B) Les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal ont été formés à un rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2, à un rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300 et à une concentration d'ADN allant de 10 à 80 µg/ml. L'activité luciférase est mesurée 24 heures après la transfection des hépatocytes primaires.

La Figure 48A indique que l'activité luciférase maximale est obtenue après transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal formés à un rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2. De plus, la Figure 48A met à nouveau en évidence l'incapacité des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108 à transférer des hépatocytes primaires. La Figure 48B montre que la quantité d'ADN permettant d'obtenir la meilleure transfection des hépatocytes primaires avec les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal est de 40 µg/mL. Par conséquent, la variation de ces deux facteurs a permis de définir les conditions optimales de transfection du système multimodulaire galactosylé. Nous avons donc testé l'efficacité de transfection des autres systèmes multimodulaires, DOSP/DOPE-ADN/F108-gal et DOSP-ADN/704-gal dans les mêmes conditions, c'est-à-dire à un rapport de charge lipide cationique/ADN de 2 et à une quantité d'ADN de 40 µg/mL.

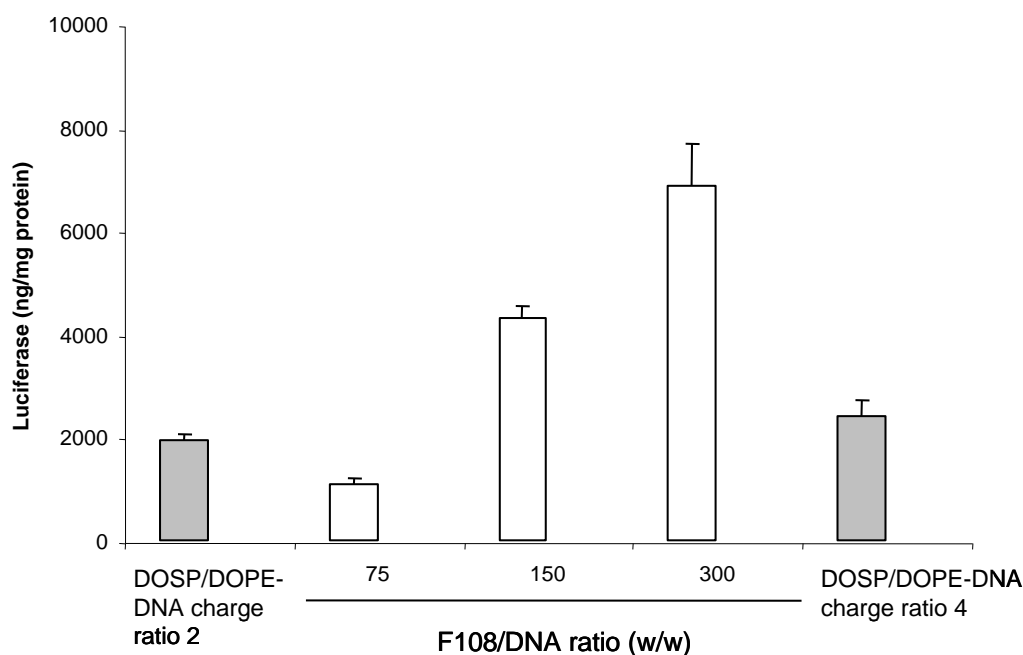
### **1.2. Efficacité de transfection des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/F108-gal**

Forts des résultats obtenus avec le système multimodulaire galactosylé précédemment décrit, nous avons décidé de faire varier la nature lipidique du cœur condensé d'ADN en remplaçant les liposomes de BGTC/DOPE par des liposomes de DOSP/DOPE. Les cellules d'hépatocytes primaires de rat ont été transfectées avec des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés à un rapport de charge de 2 et à différents rapports F108-gal/ADN (w/w) (Figure 49).

Nous avons utilisé comme contrôle négatif les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/F108 dépourvus de galactose mais préparés dans les mêmes conditions. Afin d'évaluer l'efficacité de transfection des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/F108-gal, nous avons également transfecté les cellules d'hépatocytes primaires de rat à l'aide d'un système classique composé de lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 4. Ces complexes fortement chargés positivement sont internalisés par endocytose non spécifique via les interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires et présentent une forte capacité de transfection. La Figure 49 montre que les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2 en présence de F108-gal conduisent à une transfection efficace. En revanche, en absence de galactose, les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/F108 sont incapables de transfecter les hépatocytes primaires, indiquant bien l'importance du ligand galactose dans l'internalisation de ces particules, ce qui corrobore les résultats obtenus avec les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108. De plus, la capacité de transfection des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/F108-gal augmente proportionnellement avec le rapport F108gal/ADN (w/w) et conduit, dès le rapport F108-gal/ADN (w/w) de 150, à une nette augmentation de l'expression du gène rapporteur par rapport à celle obtenue avec les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 4. En revanche, les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/F108-gal formulés au rapport F108-gal/ADN (w/w) de 75 conduisent à une expression du transgène inférieure à celle obtenue avec les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2. Ce résultat met en évidence la présence de la couronne de stabilisateurs stériques galactosylés qui décore les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés au rapport de charge 2. Le F108-gal interagit donc bien avec le cœur condensé d'ADN formé à l'électroneutralité. La formation de la couronne d'oxydes d'éthylène semble permettre de s'affranchir des interactions résiduelles non spécifiques avec les membranes

cellulaires, induites par les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2.

L'ensemble de ces résultats semblent donc indiquer que ce système multimodulaire galactosylé conduit à une transfection spécifique des hépatocytes via un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant. De plus, ce système multimodulaire galactosylé de deuxième génération s'avère plus efficace que les systèmes cationiques classiques.



**Figure 49: Efficacité de transfection des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/F108-gal et DOSP/DOPE-ADN/F108 en fonction du rapport stabilisateurs stériques/ADN (w/w).** L'activité luciférase est mesurée 24 heures après la transfection des hépatocytes primaires. Les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/F108-gal (barres blanches) et DOSP/DOPE-ADN/F108 (barres noires confondues avec la ligne de base) contiennent 40 µg ADN/ml.

Nous avons également mis au point lors de la caractérisation physico-chimique un autre système multimodulaire galactosylé composé d'un coeur condensé d'ADN DOSP/DOPE-ADN mais présentant un stabilisateur stérique différent le 704-gal. Les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/704-gal ont été transfectés dans les conditions optimisées pour le système BGTC/DOPE-ADN/F108-gal, c'est-à-dire à un rapport de charge DOSP/DOPE-ADN de 2 et à une quantité d'ADN de 40 µg/mL. Les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/704-gal n'ont pas permis de transfecter de manière significative les hépatocytes primaires, même en augmentant fortement le rapport 704-gal/ADN

(w/w) (données non présentées), ce qui pourrait être expliqué par une association légèrement moins forte des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN avec le 704-gal ou le 704. En effet, lors de la caractérisation physico-chimique du système multimodulaire DOSP/DOPE-ADN/704-gal, nous avons montré que les mesures de fluorescence du BET en solution en présence des lipoplexes galactosylés ou non galactosylés augmentaient légèrement avec le rapport 704/ADN (w/w) bien qu'aucune molécule d'ADN ne migrait dans le gel agarose pendant l'expérience d'électrophorèse (Figure 7). Cependant, les puits dans lesquels avaient été déposés les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/704-gal et DOSP/DOPE-ADN/704 étaient plus fluorescents que ceux contenant les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2, ce qui pourrait s'expliquer par une faible répulsion électrostatique entre les charges positives portées par le lipide cationique et celle portée par le 704 galactosylé ou non galactosylé quelque soit le rapport 704/ADN (w/w) utilisé. Ainsi lors de la transfection, une partie des molécules de 704-gal pourrait être dissociée du cœur condensé d'ADN et limiter la capacité de ciblage du stabilisateur stérique galactosylé. La présentation des motifs galactosyles à la surface des lipoplexes seraient donc moins importante qu'avec les autres systèmes multimodulaires galactosylés ce qui pourrait expliquer la faible efficacité de transfection des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/704-gal. En effet, l'affinité du ASPGR aux particules galactosylées dépend de la densité des résidus galactose présents à leur surface (Ashwell G and Harford J, 1982; Kawakami S *et al.*, 1998; Niidome T *et al.*, 2000). Nous avons ensuite testé l'efficacité de transfection du système multimodulaire DOSP-ADN/704-gal où l'association des lipoplexes DOSP-ADN avec le 704-gal semble plus forte qu'avec le système précédent puisqu'à partir du rapport 704-gal/ADN (w/w) de 150, les puits contenant ces complexes sont moins fluorescents lors de l'expérience d'électrophorèse (Figure 43E).

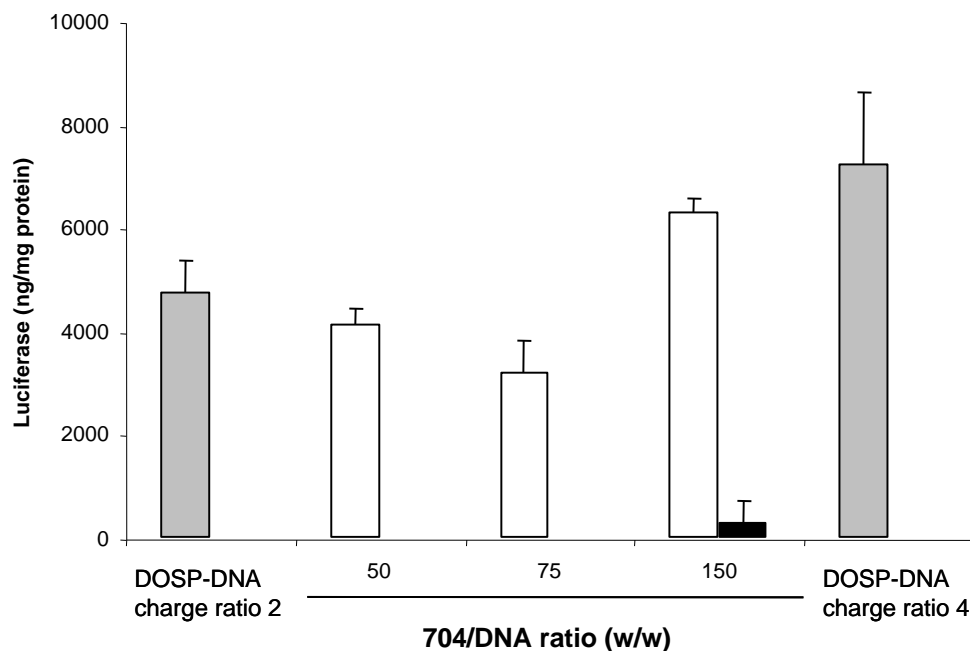
### **1.3. Efficacité de transfection des lipoplexes DOSP-ADN/704-gal**

L'efficacité de transfection des lipoplexes DOSP-ADN/704-gal formés à un rapport de charge DOSP-ADN de 2 et à une concentration d'ADN de 40 µg/mL a été évaluée en fonction des rapports 704-gal/ADN (w/w) (Figure 50). Les lipoplexes DOSP-ADN/704 servent de contrôle négatif lors de la transfection des hépatocytes primaires car ils sont dépourvus de galactose. Ces derniers ont été préparés dans

les mêmes conditions que les lipoplexes DOSP-ADN/704-gal. Des lipoplexes DOSP-ADN formés au rapport de charge +/- de 4, donc fortement chargés positivement, ont également été transfectés sur les hépatocytes primaires en tant que contrôle positif car ils sont internalisés par endocytose non spécifique via les interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires et non par un mécanisme d'endocytose médiée par récepteur.

La Figure 50 montre que les lipoplexes DOSP-ADN formés au rapport de charge de 2 en présence de 704-gal conduisent à une forte transfection des hépatocytes primaires se traduisant par une expression élevée du transgène. En effet, l'activité luciférase augmente avec le rapport 704-gal/ADN (w/w) mais de manière moins spectaculaire que pour les systèmes multimodulaires galactosylés précédents (Figure 47 et Figure 49). De plus, les lipoplexes DOSP-ADN/704 sont inactifs comme les autres lipoplexes non galactosylés. Comme pour le système multimodulaire précédent, les lipoplexes DOSP-ADN/704-gal formulés au plus faible rapport stabilisateur stérique galactosylé/ADN (w/w), conduisent à une expression du transgène inférieure à celle obtenue avec les lipoplexes DOSP-ADN formés au rapport de charge de 2. Ce résultat met à nouveau en évidence la présence de la couronne de stabilisateurs stériques galactosylés qui décore le cœur condensé d'ADN formé à l'électroneutralité. Le 704-gal interagit donc bien avec les lipoplexes DOSP-ADN formés au rapport de charge 2. La formation de la couronne d'oxydes d'éthylène permet vraisemblablement de s'affranchir des interactions résiduelles non spécifiques avec les membranes cellulaires, induites par les lipoplexes DOSP-ADN formés au rapport de charge de 2.

Ces résultats semblent donc indiquer que ce système multimodulaire assure une internalisation spécifique des particules galactosylées par endocytose spécifique via la reconnaissance du galactose porté par le 704 au niveau du site de fixation du ASPGR. Cependant, les lipoplexes DOSP-ADN/704-gal formés au rapport 704-gal/ADN (w/w) de 150 conduisant à la meilleure expression du transgène, présentent une efficacité de transfection similaire à celle obtenue avec les lipoplexes DOSP-ADN chargés positivement. Les lipoplexes DOSP-ADN/704-gal permettent néanmoins de transfecter de manière spécifique les hépatocytes primaires contrairement aux lipoplexes DOSP-ADN formés au rapport +/- de 4 internalisés vraisemblablement par endocytose non spécifique.



**Figure 50: Efficacité de transfection des lipoplexes DOSP-ADN/704-gal et DOSP-ADN/704 en fonction du rapport stabilisateurs stériques/ADN (w/w).** L'activité luciférase est mesurée 24 heures après la transfection des hépatocytes primaires. Les lipoplexes DOSP-ADN/704-gal (barres blanches) et DOSP-ADN/704 (barres noires) contiennent 40 $\mu$ g ADN/mL.

Dans le cas de ce système multimodulaire, le faible poids moléculaire du 704-gal ne semble pas influencer le ciblage du ASPGR. Pourtant, nous avons montré précédemment que pour le système BGTC/DOPE-ADN/F108-gal, la longueur du stabilisateur stérique galactosylé jouait un rôle important dans la reconnaissance de la particule par le ASPGR (Figure 50). En effet, les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et DOSP/DOPE-ADN/F108-gal présentent de meilleures efficacités de transfection que les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN et DOSP/DOPE-ADN stabilisés colloïdalement par des copolymères à blocs de masse moléculaire inférieure à celle du F108-gal comme le F68-gal ou le 704-gal. L'efficacité de ciblage des systèmes multimodulaires galactosylés serait donc influencée par la nature du stabilisateur stérique galactosylé dépendante elle-même de celle du lipide cationique utilisé pour la formation du cœur d'ADN condensé. Par conséquent, cette étude met en évidence la relation entre le stabilisateur stérique galactosylé et le lipide cationique qui joue un rôle prépondérant non seulement sur l'assemblage supramoléculaire du système mais aussi sur son efficacité de transfection au niveau de la reconnaissance cellulaire de la particule galactosylée par le ASPGR.

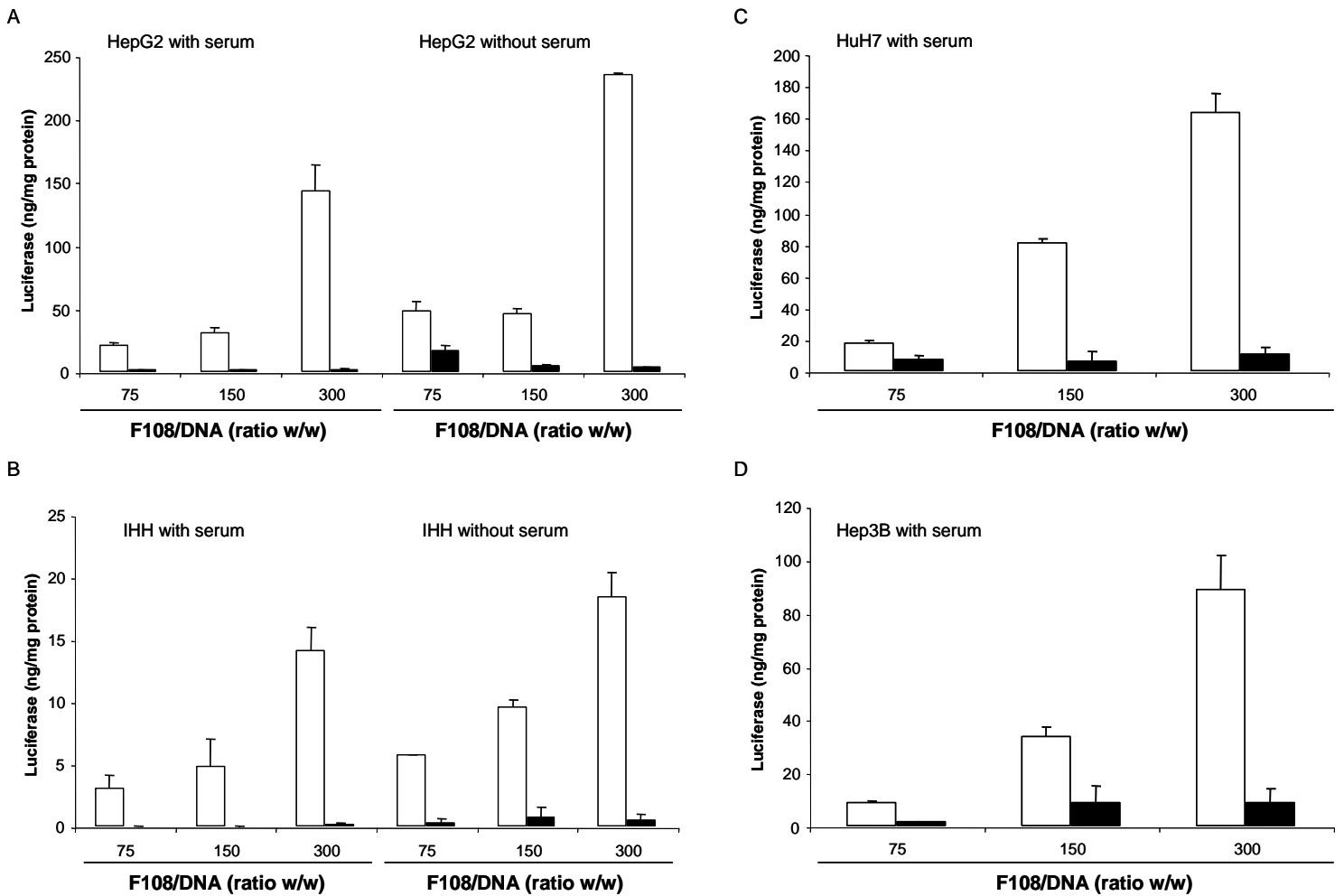
Ces tests biologiques *in vitro* ont permis de valider l'efficacité de transfection des trois systèmes multimodulaires, BGTC/DOPE-ADN/F108-gal, DOSP/DOPE-ADN/F108-gal et DOSP-ADN/704-gal en déterminant pour chacun de ces systèmes les rapports stabilisateurs stériques/ADN (w/w) qui conduisent à la plus forte expression du transgène. De plus, ces études ont souligné l'incapacité des lipoplexes non galactosylés à transférer les hépatocytes primaires, ce qui semblerait indiquer que les systèmes multimodulaires galactosylés seraient bien internalisés par endocytose spécifique via le ASPGR.

Par conséquent, différentes études complémentaires ont été réalisées pour vérifier l'efficacité de transfection des systèmes multimodulaires galactosylés sur d'autres types cellulaires présentant à leur surface le ASPGR mais également pour confirmer le mode d'internalisation des lipoplexes galactosylés dans les hépatocytes primaires.

## **2. Transfection *in vitro* de lignées d'hépatocytes en culture**

Dans un premier temps, afin de vérifier que le concept n'est pas limité aux hépatocytes primaires, nous avons testé le système multimodulaire galactosylé BGTC/DOPE-ADN/F108-gal formé à un rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2 et à une concentration d'ADN de 40 µg/mL en fonction du rapport F108-gal/ADN (w/w) sur des hépatocytes en culture, issus de différentes lignées humaines, telles qu'IHH, HepG2, Hep3B et HuH7. Tous ces types d'hépatocytes possèdent à leur surface le ASPGR. De plus, le système multimodulaire galactosylé ayant été designé dans le but d'une application *in vivo*, nous avons également, mis en œuvre une transfection du système en présence de sérum, puisque étant proche de l'électroneutralité, il ne devrait pas être sensible aux protéines anioniques contenues dans le milieu de culture supplémenté en sérum. En effet, les expériences de transfection ont été réalisées jusqu'ici en absence de sérum, car les hépatocytes primaires sont cultivés dans un milieu complexe ne nécessitant pas de sérum de veau classique.





**Figure 51: Efficacité de transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2 en présence de F108-gal ou de F108 à différents rapports F108/ADN (w/w).** Les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal (barres blanches) et BGTC/DOPE-ADN/F108 (barres noires) ont été formés à une concentration d'ADN de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . L'activité luciférase est mesurée 24 heures après la transfection des lignées d'hépatocytes; HepG2 (A), IHH (B), HuH7 (C) et Hep3B (D).

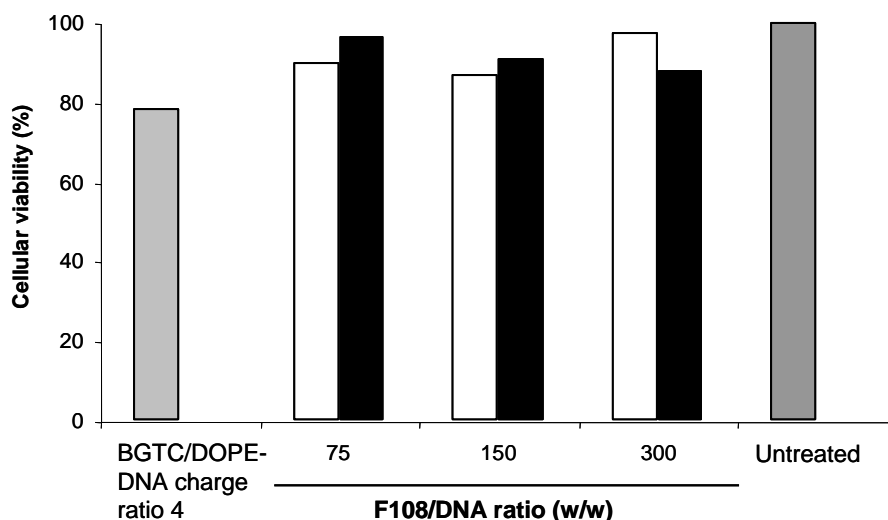
La Figure 51 montre dans un premier temps, que le système multimodulaire galactosylé BGTC/DOPE-ADN/F108-gal assure la même efficacité de transfection que dans les hépatocytes primaires. En effet, le maximum d'expression du transgène est obtenu, comme pour les hépatocytes primaires, à un rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300, et ce pour l'ensemble des lignées d'hépatocytes humains testées. De plus, les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108 ne conduisent pas à une expression significative de la luciférase et donc restent inactifs pour la transfection des hépatocytes. La Figure 51 indique également que l'activité luciférase engendrée par les lipoplexes galactosylés est similaire en présence ou en absence de sérum, quelque soit le rapport F108/ADN (w/w) (Figure 51A et 51B). Par conséquent, la présence de sérum ne modifie ni l'efficacité de transfection ni le mode

d'internalisation des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal dans les hépatocytes en culture. Les lipoplexes galactosylés sont donc internalisés dans les hépatocytes primaires ou en culture par un même mécanisme d'endocytose spécifique récepteur-dépendant. Nous avons alors ensuite évalué la toxicité du système multimodulaire galactosylé dans des cellules d'hépatocytes en culture.

### **3. Cytotoxicité des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal**

La toxicité du système multimodulaire galactosylé a ensuite été quantifiée par un dosage colorimétrique utilisant le bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium (MTT) (Figure 52). Ce test permet de déterminer la viabilité cellulaire car seules les cellules vivantes sont capables de transformer le MTT en formazan, composé coloré dont l'absorbance est détecté à une longueur d'onde de 490 nm. Les cellules HuH7 ont été transfectées en absence de sérum avec les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et BGTC/DOPE-ADN/F108 en fonction du rapport stabilisateur stérique/ADN (w/w). Les lipoplexes galactosylés et non galactosylés ont été formés à un rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2 et à une concentration d'ADN de 40 µg/mL. Des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN préparés à un rapport de charge de 4 donc fortement chargés positivement ont également été transfectés pour servir de contrôle positif. En effet, le mode d'internalisation des lipoplexes lipides cationiques/ADN par endocytose non spécifique nécessite un rapport de charge lipide cationique/ADN élevé qui induit une certaine toxicité cellulaire due à la quantité de lipide cationique utilisée pour complexer l'ADN et former ainsi des objets actifs *in vitro* chargés positivement (Figure 52).

La toxicité cellulaire est exprimée en pourcentage de cellules viables, lui-même rapporté à la densité optique mesurée dans les puits contenant les cellules non transfectées. Les puits ayant reçus les lipoplexes galactosylés ou non galactosylés présentent un pourcentage de cellules vivantes similaire aux puits non traités (Figure 52). Par contre, 24h après transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 4, il reste 80% d'hépatocytes viables dans les puits. Par conséquent le système multimodulaire galactosylé est non toxique.



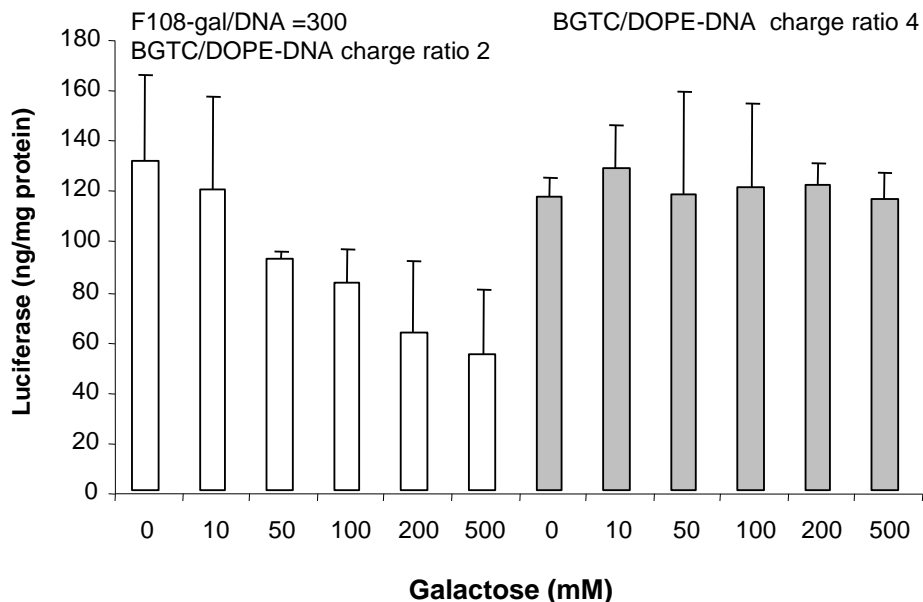
**Figure 52: Test MTT, 24h après transfection des HuH7.** 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de plasmide encodant la luciférase a été complexé aux liposomes BGTC/DOPE à un rapport de charge de 2 en présence de F108-gal (barres blanches) ou de F108 (barres noires) à différents rapports (w/w) F108/ADN.

#### 4. Spécificité du ciblage des systèmes multimodulaires galactosylés

##### 4.1. Compétition des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal

Pour vérifier le mode d'internalisation par endocytose spécifique du système multimodulaire galactosylé, différentes concentrations de galactose libre allant de 0 à 500 mM ont été ajoutées dans le milieu de transfection des hépatocytes primaires. Le galactose libre étant capable de se fixer sur le ASPGR, il y aura ainsi compétition entre les lipoplexes galactosylés et le galactose libre au niveau de la reconnaissance cellulaire ligand-récepteur. Les hépatocytes, préalablement incubés avec les différentes solutions de galactose libre, ont été transfectés avec les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal formés au rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2 et au rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300 mais également avec des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN chargés positivement (Figure 53). Les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 4 servent ici de contrôle négatif car ces particules chargées positivement ne peuvent être internalisées dans les cellules par endocytose spécifique via le ASPGR. En effet, le mécanisme d'internalisation de ces particules est régi par la voie d'endocytose non spécifique, c'est-à-dire par interactions électrostatiques avec la membrane cellulaire.

La Figure 53 montre que l'expression du transgène mesurée après transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal au rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300, en absence de galactose libre, est similaire à celui des particules chargées positivement. Cependant, lorsque la concentration en galactose libre augmente dans le milieu de transfection, l'activité luciférase des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal diminue contrairement à celle des particules chargées positivement. La présence de galactose libre n'affecte pas l'internalisation des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 4 (Figure 53). Par conséquent, ces résultats mettent en évidence l'existence d'une compétition entre les lipoplexes galactosylés et le galactose libre au niveau du ASPGR, suggérant ainsi un mécanisme récepteur-dépendant pour l'internalisation des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal dans les hépatocytes primaires.



**Figure 53: Transfection spécifique *in vitro* des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal.** Expression de la luciférase dans des cellules d'hépatocytes primaires obtenue après transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal formés au rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300 ainsi que celle des particules chargées positivement au rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 4 en fonction de la concentration de galactose libre comprise entre 0 et 500 mM ajoutée au milieu de culture 2h avant la transfection.

Pour confirmer le mécanisme d'entrée du système multimodulaire BGTC/DOPE-ADN/F108-gal dans les hépatocytes primaires, nous avons renouvelé la mise en œuvre d'une compétition, mais cette fois entre les lipoplexes galactosylés eux-mêmes.

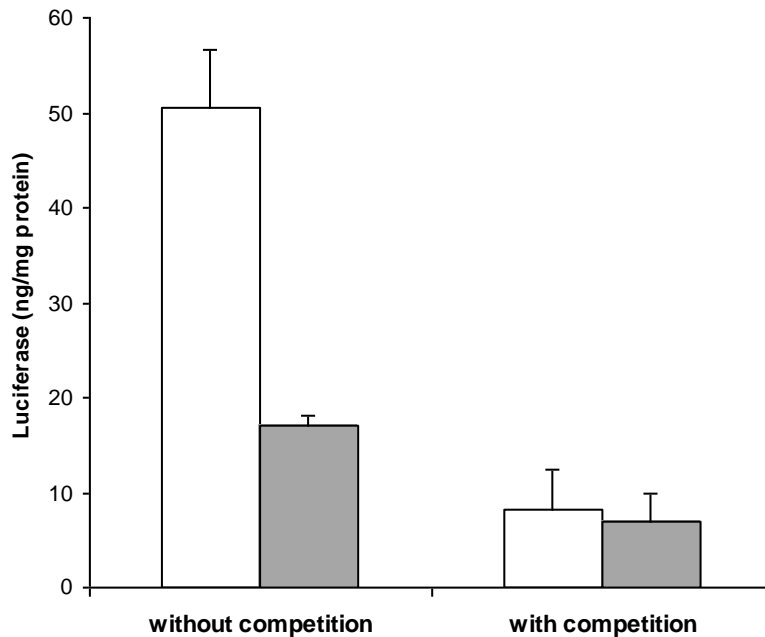
#### **4.2. Compétition entre les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal**

Pour réaliser cette compétition deux types de lipoplexes galactosylés ont été formés à une concentration identique de 40µg/mL d'ADN puis mélangés en quantités stœchiométriques lors de la transfection (Figure 54). Le premier type de particules contient un plasmide encodant la luciférase, qui a été formulé aux lipoplexes BGTC/DOPE-ADN au rapport de charge de 2 en présence de F108-gal au rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300. Le second type de particules est identique au premier mais contient un plasmide vide n'encodant aucun gène rapporteur, le plasmide pQE30.

Nous avons également formé des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN préparés à un rapport de charge de 4 contenant du pQE30 qui ont été ajoutés en quantités stœchiométriques aux liposomes BGTC/DOPE complexés à de l'ADN encodant la luciférase au rapport de charge de 4. Ces lipoplexes contenant le plasmide vide vont servir de témoin afin de s'assurer que la présence de deux fois plus d'objets ne modifie pas l'efficacité de transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés avec le plasmide encodant la luciférase. En effet, le mode d'internalisation de ces particules chargées positivement étant non spécifique, les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN devrait être internalisée dans les hépatocytes primaires que ce soit en présence ou en absence des mêmes lipoplexes BGTC/DOPE-ADN mais formulés avec un plasmide vide.

La compétition entre les particules galactosylées consiste à transférer les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal formulés à une concentration de plasmide encodant la luciférase de 40µg/mL, ce qui correspond aux conditions utilisés lors de la transfection sans compétition, en présence des mêmes lipoplexes galactosylés mais formés avec du plasmide vide à une concentration identique de 40µg/mL. Les particules contenant le plasmide vide jouent ici le rôle de compétiteur. Ainsi lors de la transfection *in vitro* des hépatocytes primaires, nous avons deux fois plus d'objets dans le milieu de culture capables de se fixer au ASPGR par rapport aux conditions de transfection sans compétiteur, c'est-à-dire avec les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal formés avec le plasmide luciférase. Par conséquent, nous pourrions nous attendre à une diminution de moitié de l'expression du transgène par rapport à celle obtenue après transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal sans

compétition. En effet, nous émettons l'hypothèse que les deux types de particules galactosylées présentent la même affinité pour le ASPGR.



**Figure 54: Compétition entre les lipoplexes galactosylés au niveau du ASPGR.** Les liposomes BGTC/DOPE ont été complexés soit avec un plasmide encodant la luciférase soit avec un plasmide vide à un rapport de charge de 4 (barres grises) ou à un rapport de charge de 2 en présence de F108-gal au rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300 (barres blanches). Les hépatocytes primaires ont été transfectés avec les lipoplexes galactosylés ou chargés positivement contenant un plasmide encodant la luciférase en absence ou en présence des mêmes lipoplexes contenant un plasmide vide mélangés à un rapport 50:50. L'activité luciférase est mesurée 24h après transfection.

La Figure 54 indique que l'activité luciférase des lipoplexes galactosylés diminue très fortement lorsque les deux types de particules contenant soit le plasmide vide soit le plasmide encodant la luciférase sont mélangés. L'activité luciférase détectée après la compétition diminue de 80% par rapport à celle obtenue sans compétition, elle est donc 30% inférieure à celle à laquelle nous aurions pu nous attendre, comme si les lipoplexes contenant le plasmide carrier étaient majoritairement internalisés au sein des hépatocytes primaires via le ASPGR. Cependant, le même phénomène est observé sur le taux d'expression du gène rapporteur lorsque les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN chargés positivement sont transfectés en présence des mêmes lipoplexes contenant le plasmide vide. En effet, la Figure 54 met en évidence une diminution de 30% de l'efficacité de transfection par rapport à celle obtenue avec les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN seul. Pourtant l'expression du transgène mesurée

après transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN, contenant le plasmide encodant la luciférase, ne devrait pas être modifiée par la présence des mêmes lipoplexes chargés positivement formés avec le pQE30, puisque ces particules présentent un mode d'internalisation par endocytose non spécifique. Ainsi, cette diminution non attendue de 30% obtenue pour les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 4, lors de la mise en compétition, pourrait être expliquée par l'excès de lipide cationique transfecté. En effet les lipoplexes sont mélangés à un rapport 50:50, ainsi la quantité totale de lipide utilisé est deux fois plus importante ce qui peut entraîner une certaine toxicité cellulaire et donc une baisse de l'efficacité de transfection.

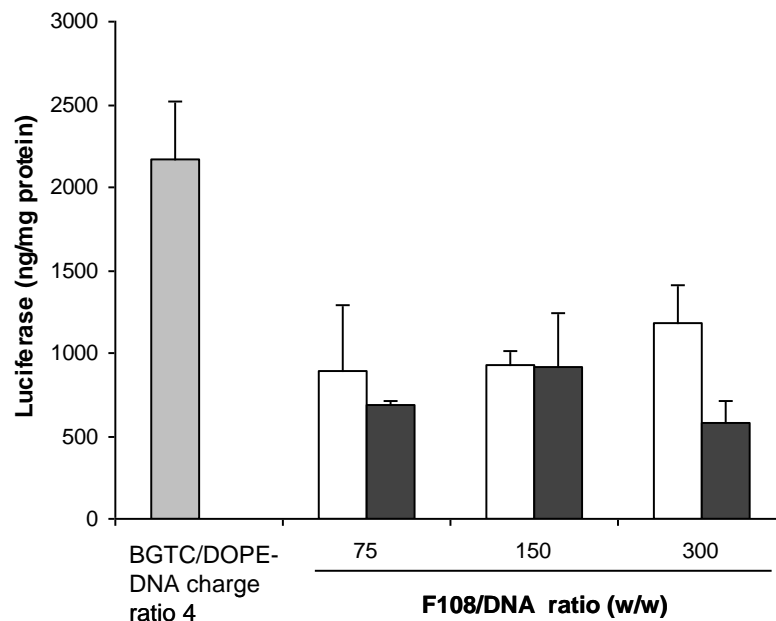
Néanmoins, l'activité luciférase des lipoplexes galactosylés diminue d'environ 80% lorsque les deux types de particules contenant soit le plasmide vide soit le plasmide encodant la luciférase sont mélangés (Figure 54). Par conséquent, en soustrayant la diminution non attendue de 30%, l'expression du transgène est donc diminuée de moitié ce qui indique qu'il y a bien compétition entre les deux types de particules galactosylées au niveau du site de fixation du ASPGR. Ces résultats corroborent ceux obtenus lors de l'essai précédent et confirment donc le mécanisme d'internalisation des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal dans les hépatocytes primaires via le ASPGR.

Pour aller plus loin dans la validation du ciblage spécifique des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal, nous avons dans un premier temps testé les lipoplexes galactosylés par transfection *in vitro* de cellules Cos7 dont la surface est dépourvue du ASPGR.

#### **4.3. Transfection *in vitro* des cellules Cos7**

Les cellules Cos7 qui sont des cellules de fibroblastes du singe vert d'Afrique n'exprimant pas le ASPGR à leur surface ont été transfectées avec les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et BGTC/DOPE-ADN/F108 en fonction du rapport F108/ADN (w/w) (Figure 55). Les lipoplexes ont été formés au rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2 et à une concentration d'ADN de 40 µg/mL. Les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN préparés au rapport de charge de 4 ont été utilisés comme contrôle positif car ils sont capables d'être internalisés dans tous les types cellulaires

par endocytose non spécifique via les interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires chargées positivement. Les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108 présentent une certaine efficacité de transfection dans le cas des cellules Cos7 contrairement aux précédentes transfections d'hépatocytes primaires ou en culture, où aucune expression du transgène n'est détectée. De plus, les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et BGTC/DOPE-ADN/F108 conduisent à la même activité luciférase quelque soit le rapport stabilisateur stérique/ADN (w/w) utilisé. Cependant, l'expression du transgène mesuré reste bien inférieure à celle obtenue après transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN chargés positivement. Par conséquent, les lipoplexes galactosylés et non galactosylés assurent donc bien le ciblage spécifique des hépatocytes via la reconnaissance du galactose au niveau du site de fixation du ASPGR.



**Figure 55: Transfection in vitro des cellules Cos7.** Expression de la luciférase dans des cellules Cos7 24h après transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN chargés positivement et des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2 en présence de F108-gal (barres blanches) ou de F108 (barres noires) en fonction du rapport F108/ADN (w/w).

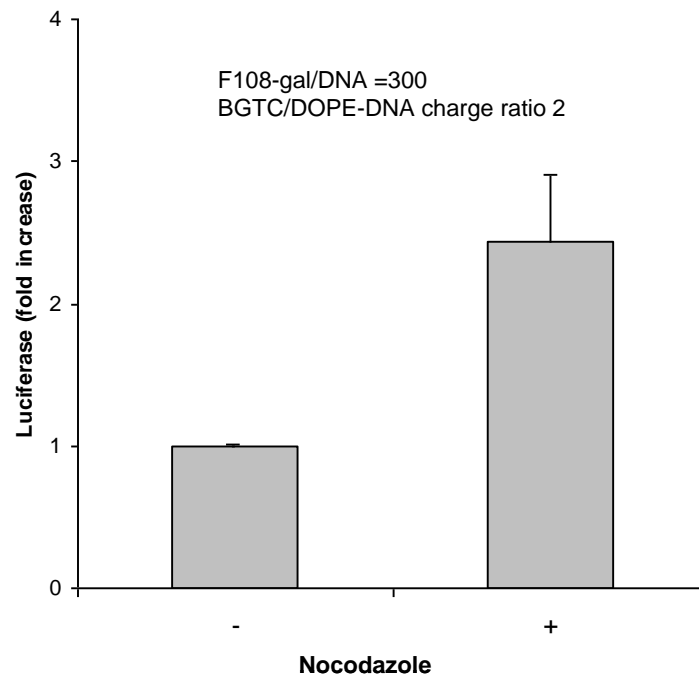
#### 4.4. Inhibition de l'endocytose spécifique

Pour valider définitivement le mécanisme d'action des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal, nous avons utilisé un inhibiteur de l'endocytose spécifique par puits de clathrine, le nocodazole qui a été pré-incubé dans le milieu de culture des hépatocytes primaires avant la transfection (Figure 56). Le nocodazole est une



substance chimique qui inhibe le transport des vésicules endosomales des endosomes précoces aux endosomes tardifs en induisant une dépolymérisation des microtubules. Cette molécule améliore donc une des étapes de l'endocytose spécifique en empêchant la dégradation lysosomale. Les hépatocytes primaires ont été transfectés avec les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés à un rapport de charge de 2 et à une concentration d'ADN de 40 µg/mL en présence de F108-gal à un rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300.

La Figure 56 montre que le pré-traitement au nocodazole augmente nettement l'efficacité de transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal dans les hépatocytes primaires. De plus, les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 4 présentent les mêmes niveaux d'expression du transgène en présence ou en absence de nocodazole (données non insérées), ce qui signifie que l'internalisation de ces particules ne passe pas par une voie d'endocytose spécifique mais bien par interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires. Par contre, la présence du nocodazole modifiant l'efficacité de transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal signifie qu'ils sont bien internalisés par un processus d'endocytose récepteur-dépendant.



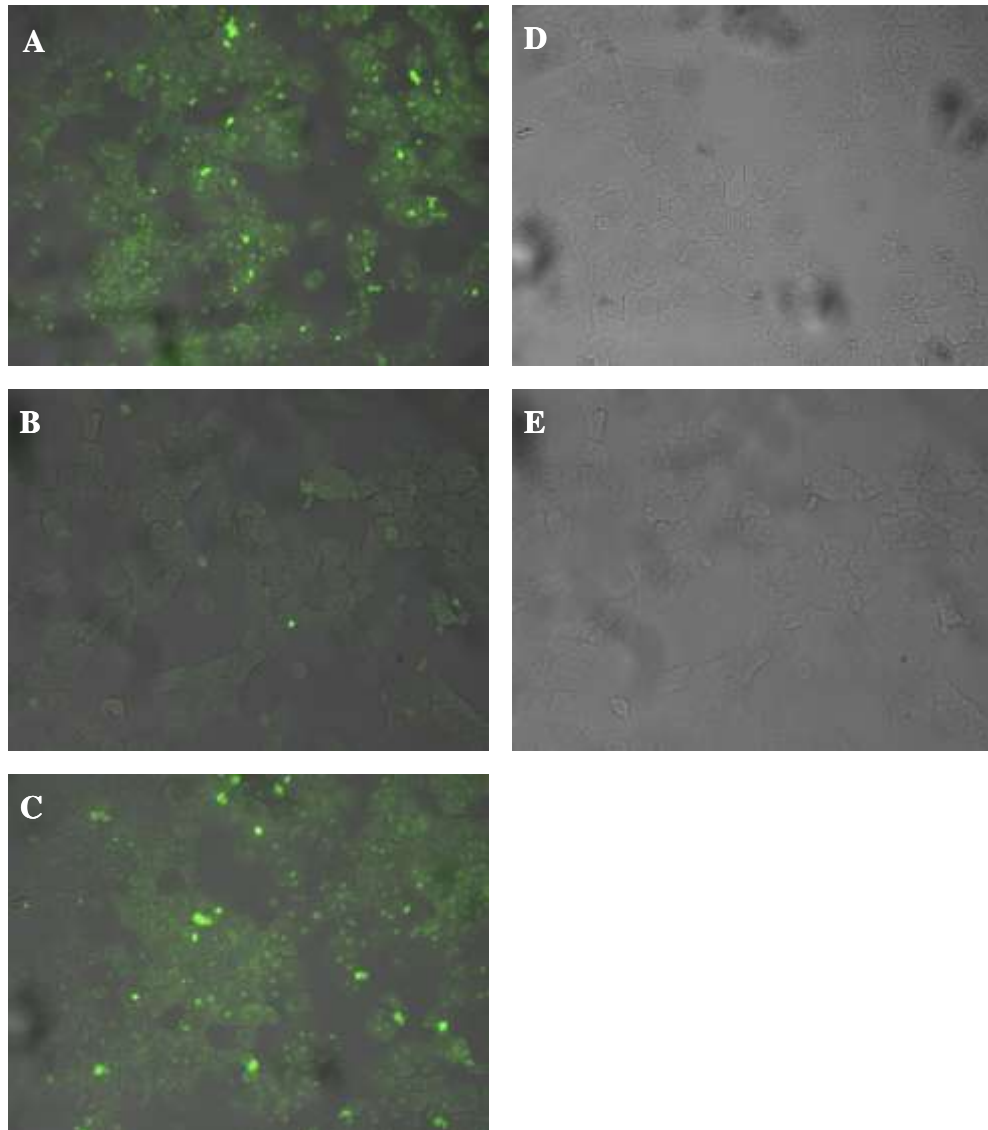
**Figure 56: Ciblage spécifique des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal.** L'activité luciférase est mesurée 24h après transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal formés au rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2 ainsi qu'au rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300 en fonction de la pré-incubation d'une solution de nocodazole à 33µM dans le milieu de transfection des hépatocytes primaires.

Pour finir, nous avons étudié la distribution des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal au sein des hépatocytes primaires pour déterminer le nombre et l'intensité des cellules transfectées.

### **5. Distribution des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal**

Pour visualiser les lipoplexes galactosylés au sein des hépatocytes primaires, nous avons dans un premier temps utilisé une sonde fluorescente le YOYO-1 qui est un intercalant de l'ADN. Ainsi les lipoplexes formés à partir de cet ADN marqué pourront être observés sous un filtre FITC puis localisés au sein des cellules transfectées (Figure 57). Les hépatocytes primaires ont été transfectés pendant 4h avec les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN formés à un rapport de charge de 4 pour servir de contrôle positif mais aussi à un rapport de charge de 2 en présence de F108-gal ou de F108 à un rapport F108/ADN (w/w) de 300 (Figure 57). Les cellules ont ensuite été observées au microscope 24h après transfection sous un filtre FITC pour détecter la fluorescence du YOYO.

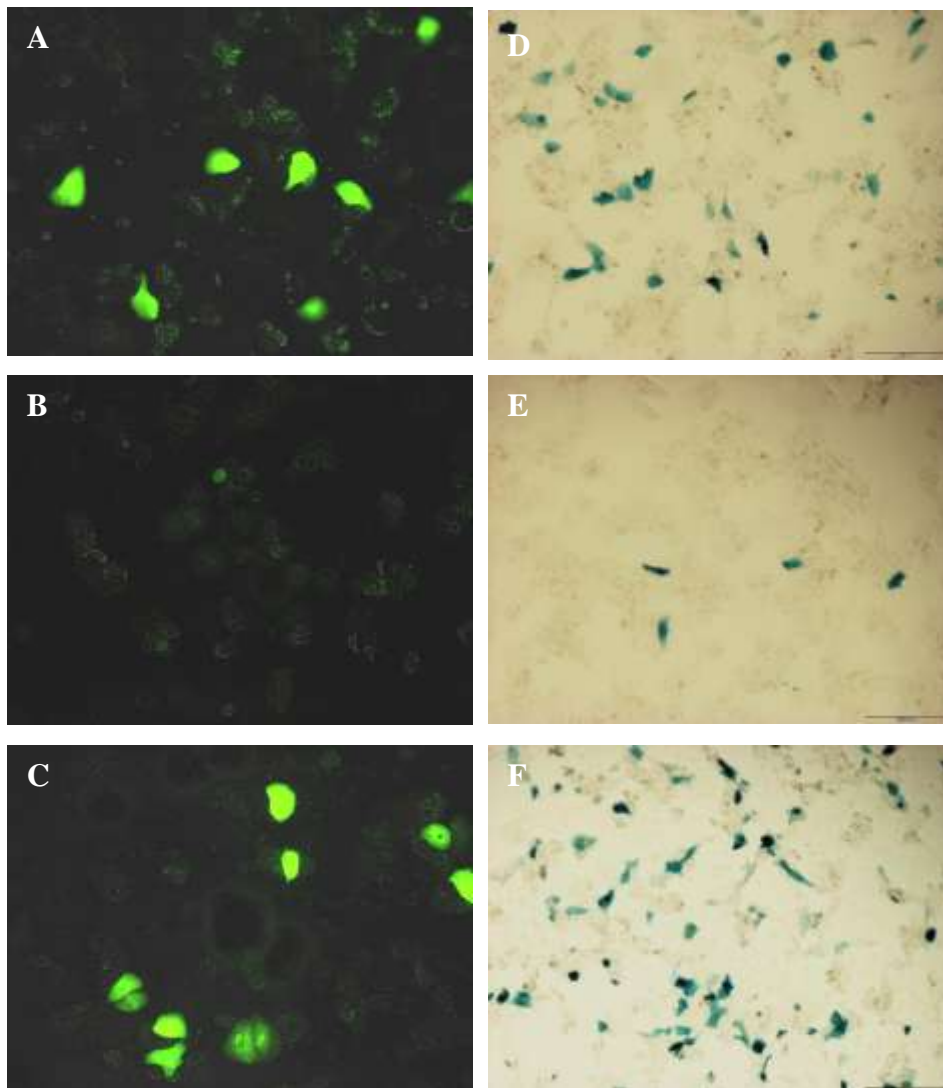
La Figure 57A montre que les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal sont détectés à l'intérieur de la plupart des hépatocytes primaires. Par contre, pour les cellules transfectées avec les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108, aucun signal fluorescent n'est observé à l'intérieur des cellules (Figure 57B) ce qui corrobore les expériences préalables de transfection où aucune expression du transgène n'a été détectée. Les lipoplexes chargés positivement servant de contrôle positif, sont également présents dans de nombreuses cellules mais sous forme d'agrégats ce qui est vraisemblablement lié à leur mode d'internalisation (Figure 57C). En effet, nous avons démontré lors des études physico-chimiques que les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN chargés positivement s'agrégeaient au cours du temps dans le milieu de transfection des hépatocytes primaires contrairement aux lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal (Figure 45). Cependant, les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et BGTC/DOPE-ADN chargés positivement semblent avoir été internalisés dans un nombre similaire de cellules (Figure 57A et 57D).



**Figure 57: Visualisation des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal (A, D), BGTC/DOPE-ADN/F108 (B, E) et BGTC/DOPE-ADN au rapport de charge 4 (C, F) dans des hépatocytes primaires.** Les molécules d'ADN ont été préalablement marquées avec le YOYO (1 molécule toutes les 150 paires de base) avant l'auto-assemblage avec les liposomes BGTC/DOPE au rapport de charge de 2 (A, B, D, E) ou au rapport de charge de 4 (C, F). Les hépatocytes primaires ont été observés sous un filtre FITC pour détecter la fluorescence du YOYO (A-C) mais aussi en contraste de phase (D-F).

Pour confirmer cette observation, nous avons ensuite transfecté des hépatocytes primaires dans les mêmes conditions que précédemment, mais cette fois au lieu d'utiliser un marqueur fluorescent de l'ADN, nous avons formulé les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et BGTC/DOPE-ADN au rapport de charge de 4 avec un plasmide encodant soit le gène rapporteur de la GFP (Green Fluorescent Protein) soit celui de la  $\beta$ -galactosidase (Figure 58).

Comme pour la Figure 57, les cellules ayant reçues les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108 n'expriment peu ou pas le transgène que ce soit la GFP ou la  $\beta$ -galactosidase (Figure 58B et 58E). La Figure 58 indique que les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et BGTC/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 4 conduisent à l'expression de la GFP (Figure 58A et 58C) ou de la  $\beta$ -galactosidase (Figure 58D et 58F) au sein des hépatocytes primaires. Comme précédemment, les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et BGTC/DOPE-ADN chargés positivement semblent avoir été internalisés dans un nombre similaire de cellules.



**Figure 58: Expression de la  $\beta$ -galactosidase et de la GFP après transfection des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal (A, D), BGTC/DOPE-ADN/F108 (B, E) et BGTC/DOPE-ADN au rapport de charge 4 (C, F) dans des hépatocytes primaires. (A-C) Les cellules ont été observées sous un filtre FITC pour détecter la fluorescence de la GFP. (D-F) Photos réalisées après révélation de l'activité  $\beta$ -galactosidase au X-gal.**

**Conclusion :**

Nous sommes parvenus grâce à l'ensemble des études physico-chimiques à concevoir trois systèmes multimodulaires galactosylés stables colloïdalement et proche de l'électroneutralité capables de transférer de manière spécifique des hépatocytes primaires. En formant ces systèmes à l'électroneutralité nous nous sommes affranchis des interactions non spécifiques avec les membranes cellulaires puisque les systèmes multimodulaires dépourvus de galactose ne conduisent pas à une expression significative de la luciférase, restant ainsi inactifs pour la transfection des hépatocytes. Les études biologiques ont permis de mettre en évidence l'efficacité de ciblage des systèmes multimodulaires galactosylés ainsi que la relation entre le stabilisateur stérique galactosylé et le lipide cationique. En effet, elle joue un rôle prépondérant non seulement sur l'assemblage supramoléculaire du système mais aussi sur son efficacité de transfection au niveau de la reconnaissance cellulaire de la particule galactosylée par le ASPGR

Les études de transfection ont également permis de confirmer les propriétés de ciblage du système multimodulaire en le mettant en compétition avec le galactose libre ainsi qu'avec les mêmes lipoplexes galactosylés mais formés avec du plasmide vide car ces molécules possèdent la capacité de se fixer aux ASPGR. En présence de ces molécules, le niveau d'expression du transgène obtenu après transfection des lipoplexes galactosylés est fortement diminué. De plus, nous avons aussi pu vérifier le mécanisme d'action des lipoplexes galactosylés en utilisant un inhibiteur de l'endocytose spécifique par puits de clathrine, le nocodazole qui a été pré-incubé dans le milieu de culture des hépatocytes primaires avant la transfection. Le pré-traitement au nocodazole conduit à une nette augmentation de la transfection des lipoplexes galactosylés dans les hépatocytes primaires. Ainsi, le système multimodulaire galactosylé est internalisé dans les cellules hépatiques par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendante via la reconnaissance cellulaire par le ASPGR grâce au galactose porté par le système.

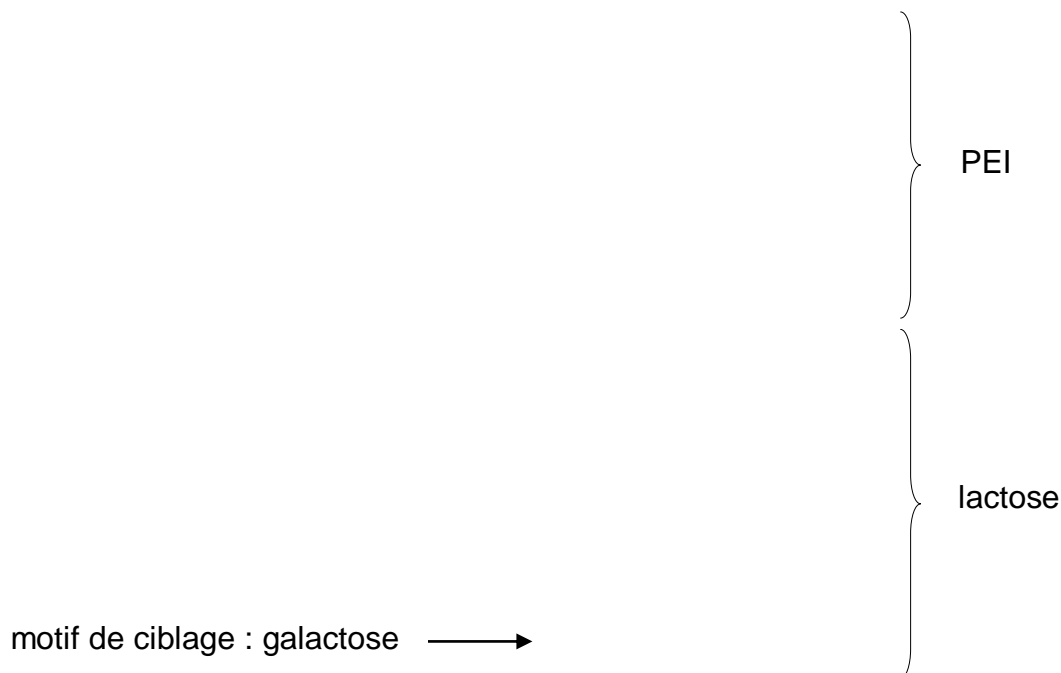
### **PARTIE 3 : Développement d'une nouvelle classe de vecteurs pour le transfert de gène dans le tissu pulmonaire**

---

Le transfert de gène non viral dans les poumons représente un enjeu majeur pour traiter de nombreuses pathologies pulmonaires acquises ou héréditaires comme la mucoviscidose. Différentes familles de vecteurs synthétiques comme les lipides cationiques (bis-guanidinium-tren-cholestérol (BGTC), lipopolyamine), les polymères cationiques (polylysine (PLL), polyéthylèneimine (PEI)) (Ferrari S *et al.*, 1997; McLachlan G *et al.*, 1995) et les copolymères à blocs amphiphiles (Desigaux L *et al.*, 2007) ont été étudiées pour le transfert de gène dans cet organe. Les lipides cationiques conduisent après injection par voie systémique à la transfection des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et à non à celle des cellules épithéliales pulmonaires. De plus, si les polymères cationiques transfectent les cellules épithéliales pulmonaires, leur injection par voie intratrachéale entraîne une forte inflammation ainsi qu'un important infiltrat cellulaire (Ruiz FE *et al.*, 2001; Zabner J *et al.*, 1997). Pour pallier le manque d'efficacité et la forte cytotoxicité de ces vecteurs synthétiques cationiques, une nouvelle classe de vecteurs synthétiques non toxiques, les copolymères à blocs amphiphiles ioniques et non ioniques, a été développée pour le transfert de gène dans les poumons (Desigaux L *et al.*, 2005). L'injection intratrachéale de ces vecteurs conduit à une plus forte expression du transgène dans le tissu pulmonaire que celle obtenue avec les vecteurs cationiques et notamment, au niveau des cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires. En parallèle, pour améliorer l'efficacité de transfection et diminuer la toxicité des vecteurs synthétiques cationiques couramment utilisés, différentes équipes ont substitués ces vecteurs par des résidus glycosidiques comme le lactose ou le mannose qui sont reconnus spécifiquement par des récepteurs membranaires de type lectines présents à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Monsigny M *et al.*, 1998; Midoux M *et al.*, 1993).

Ainsi, l'optimisation du potentiel de transfert de gène des copolymères à blocs par greffage d'un ligand à leurs extrémités permettrait d'augmenter le ciblage des cellules épithéliales pulmonaires, ce qui en ferait des vecteurs prometteurs pour de nombreuses applications thérapeutiques dans le cadre de maladies acquises ou héréditaires comme la mucoviscidose

En effet, la présence de résidus glycosidiques aux extrémités des vecteurs synthétiques cationiques a permis d'améliorer significativement la transfection des cellules épithéliales pulmonaires (Fajac I *et al.*, 2003; Grosse S *et al.*, 2004; Klink DT *et al.*, 2001; Kollen WJ *et al.*, 1999b) Grosse et al. ont développé un dérivé de PEI fonctionnalisé par des résidus lactosyles dont l'efficacité de transfection a été étudiée *in vitro* dans une lignée de cellules épithéliales des voies aériennes humaines (Grosse S *et al.*, 2004). Le polyéthylèneimine lactosylé (Lac-PEI) conduit à une nette augmentation de l'efficacité de transfection par rapport à celle observée avec le PEI non substitué. Par conséquent, l'augmentation de l'expression du transgène est due à la présence du ligand et plus particulièrement à celle du galactose. En effet, le lactose qui est un dissaccharide n'est pas le motif de ciblage car la fonctionnalisation chimique du PEI a entraîné l'ouverture de la première unité saccharidique du lactose, ne laissant ainsi plus que le galactose comme réel motif de ciblage des cellules épithéliales (Figure 59). Cependant, la toxicité du PEI *in vivo* limitent son développement.



**Figure 59: Structure chimique du Lac-PEI.** La fonctionnalisation du PEI par amination réductrice conduit à l'ouverture de l'unité glucose (rouge). Seule l'unité galactose sous forme fermée (bleue) joue le rôle de ligand et peut être reconnue par le récepteur membranaire.

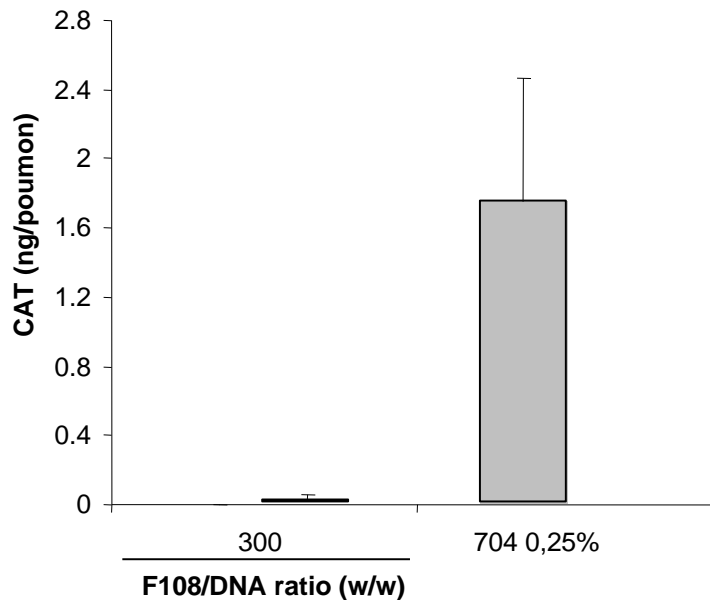
Dans ce contexte, nous avons donc logiquement décidé d'utiliser le système multimodulaire BGTC/DOPE-ADN/F108-gal qui a été développé précédemment dans cette étude pour cibler spécifiquement les hépatocytes primaires, par endocytose récepteur-dépendant via la reconnaissance cellulaire galactose-ASPGR. En effet, le système multimodulaire est composé d'un cœur condensé d'ADN stabilisé par une couronne de copolymères à blocs amphiphiles dont les extrémités distales sont fonctionnalisées par des résidus galactosyles (Schéma 4 et Schéma 6). Les copolymères à blocs amphiphiles étant une nouvelle classe de vecteurs synthétiques efficaces pour le transfert de gène dans les poumons (Desigaux L *et al.*, 2005), le système multimodulaire galactosylé semble être une approche prometteuse pour le transfert de gène dans le tissu pulmonaire spécifique. Le système multimodulaire galactosylé serait ainsi internalisé spécifiquement par les cellules épithéliales des voies aériennes par reconnaissance du galactose au niveau des récepteurs membranaires présents à la surface de ces cellules. De plus, la toxicité de ce système avait été évaluée sur des hépatocytes primaires de rat dans la partie 2 de cette thèse et bien qu'il soit composé d'un cœur d'ADN condensé par des liposomes de BGTC/DOPE, le nombre de cellules viables détectées après la transfection était similaire à celui obtenu pour les cellules non traitées (Figure 52). Par conséquent, le système multimodulaire BGTC/DOPE-ADN/F108gal est non toxique.

### **1. Le système multimodulaire galactosylé BGTC/DOPE-ADN/F108-gal**

Le système multimodulaire BGTC/DOPE-ADN/F108-gal formé un rapport de charge BGTC/DOPE-ADN de 2 en présence de F108-gal à un rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300 a été injecté par voie intratrachéale dans des poumons de souris CD1 (Figure 60). Des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108 ont également été préparés dans les mêmes conditions que les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal afin de les utiliser comme contrôle négatif. Ces lipoplexes n'étant pas équipés de galactose, ils devraient conduire à une expression non significative du transgène dans les poumons de souris. Nous avons également transfectés des complexes 704/ADN formulés à partir d'une solution de 704 à 0,25% (w/v) en tant que contrôle positif car ils assurent une forte expression du transgène dans le tissu pulmonaire. En effet, le 704 est un copolymère à blocs amphiphile ionique appartenant à une nouvelle classe de vecteurs synthétiques développée au laboratoire qui présente une forte efficacité



de transfection dans les poumons. L'ensemble des complexes ont été préparés avec 25 µg de plasmide encodant la chloramphénicol-acétyltransférase (CAT). L'activité de la CAT est déterminée par dosage ELISA 48h après l'injection par voie intratrachéale (Figure 60).



**Figure 60: Expression du gène rapporteur de la CAT dans des poumons de souris, deux jours après injection en intratrachéale des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal (barre blanche) et BGTC/DOPE-ADN/F108 (barre noire) formés à un rapport de charge BGCT/DOPE-ADN de 2 et à un rapport F108/ADN (w/w) de 300 ainsi que des complexes 704/ADN (barre grise) formulés à une concentration de 704 à 0,25%.**

La Figure 60 montre que les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et BGTC/DOPE-ADN/F108 ne permettent pas de transférer de manière significative les poumons de souris. Par contre, les complexes 704/ADN conduisent à une forte activité de la CAT. Ces résultats semblent donc indiquer que le système multimodulaire BGTC/DOPE-ADN/F108gal n'est pas adapté au transfert de gène dans les poumons. Cependant, dans l'optique d'améliorer le potentiel de transfert de gène dans le tissu pulmonaire par ciblage des lectines membranaires présentes à la surface des poumons, la présence des copolymères à blocs fonctionnalisés par des résidus galactosyles est indispensable. Par conséquent, nous avons décidé d'utiliser directement, les copolymères à blocs galactosylés comme seuls systèmes de vectorisation de l'ADN. L'efficacité de transfection des copolymères à blocs sera ainsi optimisée par le ciblage spécifique des cellules épithéliales pulmonaires grâce aux résidus galactosyles greffés à leurs extrémités

## 2. Les copolymères à blocs galactosylés

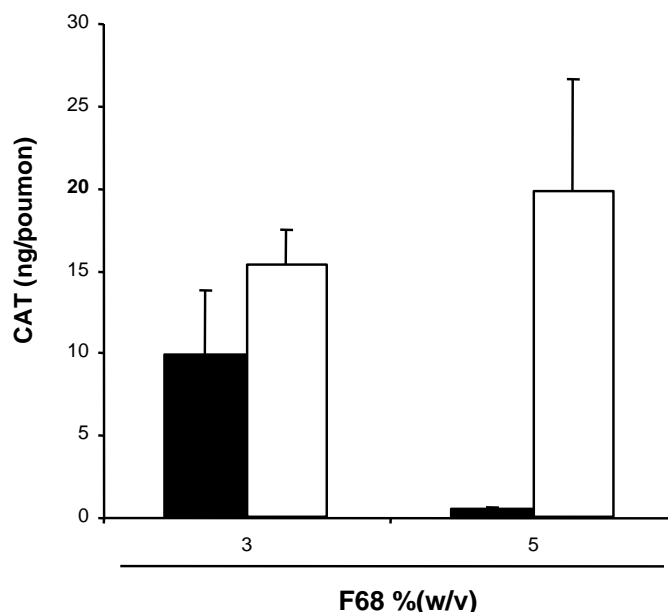
Les copolymères à blocs galactosylés utilisés dans cette étude ont été obtenus après fonctionnalisation des copolymères à blocs amphiphiles ioniques 704 (Schéma 1B) et non ioniques F68 et F108 (Schéma 1A) par une réaction de galactosylation chimique (Schéma 4 et Schéma 6). Nous obtenons donc deux copolymères à blocs non ioniques galactosylés, le F68-gal **3a** et le F108-gal **3b** ainsi qu'un copolymère à blocs ionique galactosylé, le 704-gal **15**.

### 2.1 Les copolymères à blocs non ioniques galactosylés

#### 2.1.1. F68-gal

Pour confirmer l'approche du transfert de gène dans le tissu pulmonaire par les copolymères à blocs galactosylés, le gène rapporteur de la CAT a été formulé dans un premier temps au F68-gal à différentes concentrations puis injectés dans les poumons de souris par injection intratrachéale (Figure 61). Des complexes F68/ADN ont également été injectés à différentes concentrations pour servir de contrôle positif.

Deux jours après l'injection, les poumons sont prélevés, broyés puis l'expression de la protéine CAT est évaluée par un test ELISA (Figure 61).

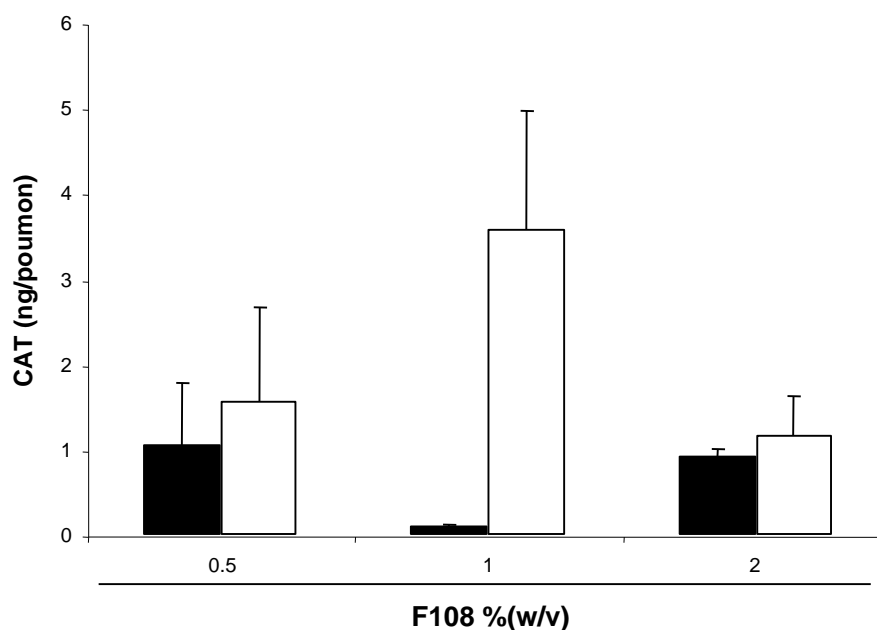


**Figure 61: Activité de la CAT après injection en intratrachéale de 100 µg d'ADN formulé au F68-gal (barres blanches) et au F68 non substitué (barres noires) à différentes concentrations (% w/v).**

La Figure 61 montre que les complexes F68-gal/ADN conduisent à une nette augmentation de l'expression du transgène et ce d'autant plus, lorsque la concentration de F68-gal augmente. Par contre, la tendance inverse est observée avec les complexes F68/ADN. En effet, le F68 à 3% présente une activité de la CAT bien supérieure à celle obtenue avec le F68 à 5%. Par conséquent, bien que le F68 non galactosylé soit efficace pour le transfert de gène dans le tissu pulmonaire, la présence du galactose améliore significativement l'efficacité de transfection du F68. Ces résultats encourageants nous ont poussés à évaluer l'efficacité de transfection d'un autre copolymère à blocs non ionique galactosylé le F108-gal.

### 2.1.2. F108-gal

Le gène rapporteur de la CAT a été formulé au F108-gal ainsi qu'au F108 à différentes concentrations puis injecté dans les poumons de souris par injection intratrachéale (Figure 62). Les complexes F108/ADN ont été injectés en tant que contrôle positif. L'efficacité de transfection des copolymères à blocs galactosylés ou non galactosylés a été évaluée 48h après l'injection par dosage ELISA (Figure 62).



**Figure 62: Activité de la CAT après injection en intratrachéale de 100 µg d'ADN formulé au F108-gal (barres blanches) et au F108 non galactosylé (barres noires) à différentes concentrations (% w/v).**

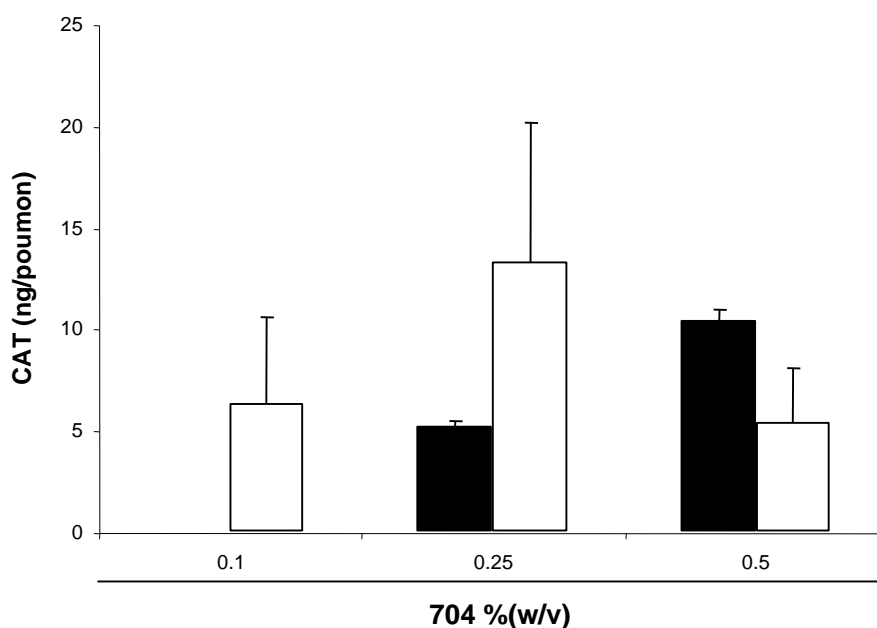
La Figure 62 indique que les complexes F108-gal/ADN conduisent également à une nette augmentation de l'expression du gène rapporteur jusqu'à une

concentration de F108-gal de 1%. En effet au-delà de cette concentration l'activité CAT diminue, mais reste cependant supérieure à celle obtenue avec les complexes F108/ADN. De plus, comme pour les complexes F68/ADN, en absence de galactose, les complexes F108/ADN sont moins efficaces que les complexes F108-gal/ADN. Par conséquent ces résultats confirment donc que la fonctionnalisation des copolymères à blocs non ioniques par un résidu galactosyl améliore considérablement l'efficacité de transfection des copolymères à blocs natifs.

Cependant, pour vérifier que le concept n'est pas limité aux copolymères à blocs non ioniques, nous avons également évalué l'efficacité de transfection d'un autre type de copolymère à blocs, le 704.

### 2.2 704-gal, copolymère à blocs ionique galactosylé

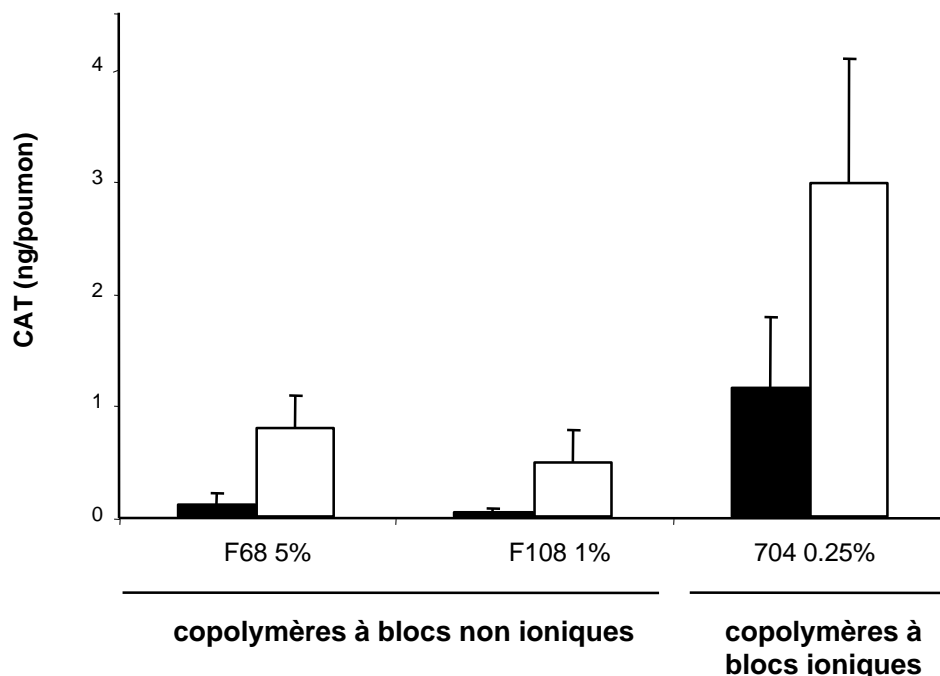
L'efficacité de transfection du 704-gal a également été évaluée après injection intratrachéale des complexes 704-gal/ADN en fonction de la concentration du copolymère à blocs galactosylé (Figure 63). Les complexes 704/ADN ont été préparés dans les mêmes conditions que les complexes 704-gal/ADN pour servir de contrôle positif comme les autres complexes copolymères à blocs non galactosylés/ADN.



**Figure 63: Activité de la CAT après injection en intratrachéale de 100 µg d'ADN formulé au 704-gal (barres blanches) et au 704 parent (barres noires) à différentes concentrations (% w/v).**

Dans ce cas aussi, nous pouvons observer une meilleure expression du transgène après injection intratrachéale des complexes 704-gal/ADN comparé aux complexes 704/ADN (Figure 63). Les complexes 704-gal/ADN conduisent à une nette augmentation de l'expression du gène rapporteur jusqu'à une concentration de 704-gal de 0,25%. Cependant au-delà de cette concentration, l'activité de la CAT mesurée est inférieure à celle obtenue avec les complexes 704/ADN. En revanche pour des concentrations plus élevées en 704, les complexes 704/ADN entraînent une forte mortalité des animaux injectés contrairement aux complexes 704-gal/ADN. Néanmoins, pour des concentrations inférieures à 0,25% les complexes 704-gal/ADN restent plus efficaces que les complexes 704/ADN. Par conséquent, le greffage de résidus galactosyl aux extrémités distales du 704 améliore encore le potentiel de transfert de gène des copolymères à blocs dans les poumons.

Nous avons ensuite déterminé parmi les trois copolymères à blocs galactosylés testés préalablement, celui qui conduit à la meilleure efficacité de transfection mais également à la meilleure optimisation du potentiel de transfert de gène des copolymères à blocs parents au sein d'une même expérience (Figure 64).



**Figure 64: Comparaison de l'efficacité de transfection des copolymères à blocs galactosylés non ioniques ou ioniques, 48h après injection intratrachéale. Expression du gène rapporteur de la CAT après injection de 100 µg d'ADN complexé aux copolymères à blocs galactosylés (barres blanches) ou non galactosylé (barres noires).**

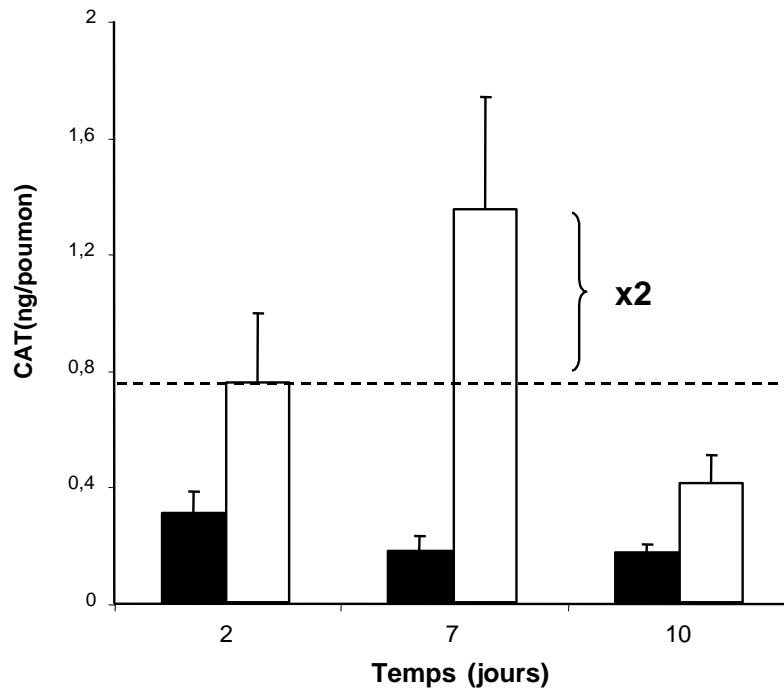
Chacun des copolymères à blocs a été transfecté à la concentration assurant le maximum d'expression du transgène (Figure 61, Figure 62 et Figure 63). Cent µg d'ADN encodant la CAT a donc été complexé au F68-gal, F108-gal et 704-gal à une concentration de 5, 1 et 0,25% respectivement puis injectés en intratrachéale dans des poumons de souris. Les complexes copolymères à blocs non galactosylés/ADN ont été préparés aux mêmes concentrations.

Les complexes 704-gal/ADN conduisent à la plus forte expression du transgène mais également à une nette augmentation de l'efficacité de transfection par rapport aux complexes copolymères à blocs parents/ADN (Figure 64). En effet, les complexes 704-gal/ADN permettent d'obtenir une activité de la CAT très élevée comparée aux complexes F68-gal/ADN et F108-gal/ADN. Cette différence significative peut être expliquée soit par la nature du 704 soit par le taux d'incorporation des résidus galactosyles aux extrémités des copolymères à blocs. En effet, le 704 possède des propriétés physico-chimiques différentes de celles du F68 et du F108 de par notamment son caractère légèrement ionique qui le rend peut-être plus efficace pour le transfert de gène. De plus, le 704-gal présente un taux d'incorporation du galactose de 65% contrairement au F68-gal et au F108-gal qui sont caractérisés respectivement par 34 et 44% de galactose greffé.

Par conséquent, il semblerait que la nature du vecteur et/ou le taux d'incorporation des résidus galactosyles jouent un rôle important dans l'efficacité de transfection de ces nouveaux vecteurs galactosylés. Ainsi, plus le nombre de résidus galactosyles greffés augmente, plus l'expression du transgène est importante au sein du tissu pulmonaire. La présence du galactose semble donc augmenter le nombre de cellules épithéliales pulmonaires transfectées. Par conséquent, pour confirmer l'efficacité de transfection des copolymères à blocs galactosylés, les expériences complémentaires ont été réalisées avec les complexes 704-gal/ADN préparés à partir d'une concentration de 704-gal de 0,25%.

### 3. Cinétique de l'expression du gène rapporteur

La cinétique d'expression de la protéine CAT a ensuite été étudiée pour évaluer l'influence du galactose sur l'efficacité de transfection des copolymères à blocs au cours du temps. 100 µg de plasmide encodant la CAT a été formulé avec du 704-gal ou du 704 0,25% puis injectés en intratrachéale dans des poumons de souris (Figure 65).



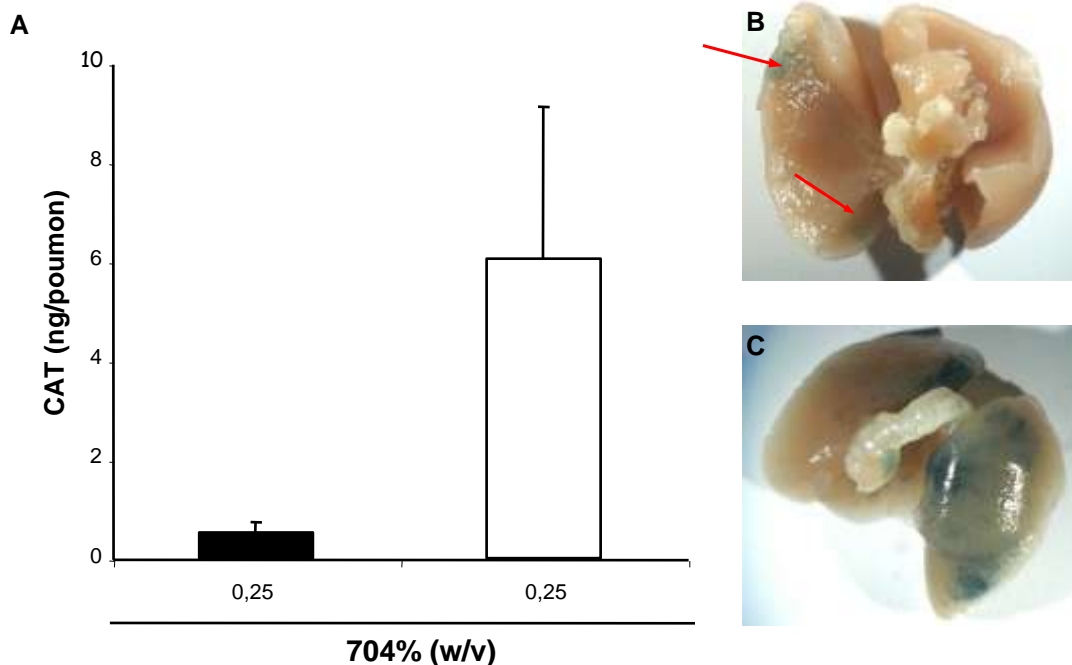
**Figure 65: Cinétique d'expression de la CAT après injection intratrachéale des complexes 704gal/ADN et 704/ADN contenant 100 µg ADN formulé à 0,25% de 704gal et de 704.**

Comme précédemment, nous retrouvons la nette augmentation de l'expression du transgène deux jours après injection intratrachéale des complexes 704-gal/ADN par rapport à celle obtenue avec les complexes 704/ADN. De plus, l'expression de la CAT continue à augmenter jusqu'à 7 jours après l'injection alors qu'avec le 704 non galactosylé la quantité de protéine commence à diminuer (Figure 65). Dix jours après l'injection, le 704-gal permet encore de maintenir l'expression de la protéine CAT qui reste toujours supérieure à celle obtenue avec le 704 non galactosylé. Par conséquent, contrairement aux vecteurs cationiques qui conduisent à une expression maximale du transgène 2 jours après injection dans les poumons (Densmore CL *et al.*, 2000), le 704-gal permet non seulement une augmentation de l'expression du transgène jusqu'à 7 jours après l'injection mais permet également de maintenir l'expression de la protéine 10 jours après délivrance.

Forts de ces résultats, nous avons décidé d'utiliser un autre mode d'administration moins invasif, le Microsprayer<sup>®</sup>, dont l'efficacité a été démontrée lors de la délivrance d'adénovirus de type 2 dans l'épithélium pulmonaire de macaque Rhésus (Beck SE *et al.*, 2002; Fischer AC *et al.*, 2007). L'utilisation du Microsprayer<sup>®</sup> assurerait ainsi une répartition plus homogène des complexes copolymères à blocs galactosylés/ADN dans l'ensemble des poumons et permettrait donc d'améliorer encore le potentiel de transfert de gène des copolymères à blocs.

#### 4. Délivrance des copolymères à blocs galactosylés par Microsprayer

Par conséquent, dans les mêmes conditions que pour les injections en intra-trachéale, le 704 galactosylé ou non galactosylé est formulé à un plasmide encodant la CAT puis la quantité de protéines est ensuite évalué 48h après injection par ELISA (Figure 66A). Parallèlement, le 704-gal à 0,25% (w/v) a été complexé au gène rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase afin de visualiser la distribution de l'expression du transgène dans les poumons (Figure 66C). La même injection a été réalisée avec le 704 pour servir de contrôle positif (Figure 66B).



**Figure 66: Expression et localisation du gène rapporteur dans des poumons de souris 48h après injection par Microsprayer<sup>®</sup>.** (A) Activité de la CAT après injection des complexes 704-gal/ADN et 704/ADN contenant 100  $\mu$ g ADN formulé à 0,25% de 704-gal ou de 704. Distribution de la  $\beta$ -galactosidase après injection de 100  $\mu$ g d'ADN complexé avec le 704 (B) ou le 704-gal (C) à 0,25% (w/v).



La Figure 66A montre que l'injection par Microsprayer® ne modifie pas l'efficacité de transfection du 704-gal puisque l'augmentation de l'expression du transgène est à nouveau observée comme lors des injections en intratrachéale. De plus, ce mode d'administration permet de souligner de manière encore plus évidente l'amélioration du potentiel de transfert de gène des copolymères à blocs parent (Figure 66A), qui étaient déjà une classe de vecteurs synthétiques efficaces pour le transfert de gène dans le tissu pulmonaire. De plus, ces résultats sont corroborés par la photo du poumon in toto injecté avec les complexes 704-gal/ADN (Figure 66C). En effet, la Figure 66C montre que l'injection des complexes 704-gal/ADN a permis une distribution beaucoup plus importante et diffuse dans l'ensemble des poumons par rapport à celle obtenue avec les complexes 704/ADN, où la  $\beta$ -galactosidase n'est que faiblement localisée à la périphérie des poumons. Par conséquent, la transfection des complexes 704-gal/ADN conduirait à un plus grand nombre de cellules pulmonaires transfectées que les complexes 704/ADN. Cependant, il reste à déterminer le type de cellules ciblé par les complexes 704-gal/ADN. Des analyses histochimiques par immunomarquage du transgène devraient permettre de mettre en évidence les cellules qui ont reçu les complexes 704-gal/ADN.

### **Conclusion :**

Les copolymères à blocs galactosylés correspondent à une nouvelle génération de vecteurs synthétiques adaptés au transfert de gène dans le tissu pulmonaire, capable d'améliorer le potentiel de transfert de gène des vecteurs de la première génération quelque soit le mode d'administration dans des poumons de souris saines. De plus, cette nouvelle génération de vecteurs permet d'atteindre un maximum d'expression du transgène 7 jours après l'injection contrairement aux copolymères à blocs parent, ce qui tendrait vers l'hypothèse d'un autre type cellulaire transfecté. Cependant, même s'il reste encore à déterminer le type de cellule transfecté par ces nouveaux vecteurs, de nouvelles perspectives pour le transfert de gène dans le tissu pulmonaire ciblé peuvent être envisagées en de nombreuses applications qui pourront être développées par exemple, pour différentes approches thérapeutiques de la mucoviscidose.

## **V - DISCUSSION**

## DISCUSSION ,PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

---

Le développement de nouveaux systèmes de délivrance capables de transporter spécifiquement *in vitro* et *in vivo* des acides nucléiques au sein des cellules cibles représente aujourd'hui un enjeu majeur pour le transfert de gène.

Au cours de cette thèse, j'ai donc mis au point deux systèmes de transfert de gène dans le but de cibler spécifiquement des cellules hépatiques ou pulmonaires. En effet, le foie comme le poumon constituent des cibles privilégiées pour le traitement de nombreuses maladies acquises ou héréditaires telles que l'hypercholestérolémie familiale ou les cancers pour le foie et la mucoviscidose pour les poumons. Le premier système consiste à conjuguer les caractéristiques intrinsèques de 3 modules pour cibler spécifiquement des cellules hépatiques *in vitro* :

- Un module lipide cationique, visant à condenser l'ADN par interactions électrostatiques entre les charges positives portées par les lipides et les charges négatives présentées par l'ADN afin de conduire à un cœur condensé d'ADN proche de l'électroneutralité.

- Un module copolymères à blocs, servant à stabiliser colloïdalement le cœur condensé d'ADN en formant une couronne périphérique d'oxydes d'éthylène et qui permet de s'affranchir des interactions résiduelles non spécifiques avec les membranes cellulaires induites par les complexes lipide cationique/ADN.

- Un module ligand, déterminant pour le ciblage spécifique des cellules hépatiques par reconnaissance des motifs de ciblage galactose liés aux extrémités des oxydes d'éthylène de la couronne du système multimodulaire par le ASPGR présent à la surface de ces cellules.

Le deuxième système correspond à l'optimisation du potentiel de transfert de gène des copolymères à blocs dans le tissu pulmonaire en augmentant leur capacité à transfecter préférentiellement les cellules épithéliales pulmonaires grâce à la technologie de ciblage développée pour le système multimodulaire.

### ***Transfert de gène ciblé dans des cellules d'hépatocytes primaires***

Les nombreux vecteurs synthétiques cationiques synthétisés depuis une dizaine d'années présentent une forte efficacité de transfection *in vitro* (Mislick KA and Baldeschwieler JD, 1996; Pitard B et al., 2002a). Leur efficacité de transfection repose sur la forte densité de charges positives présentes à la surface des

complexes vecteurs cationiques/ADN qui leur permet d'être internalisés par interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires portant des molécules chargées négativement (Labat-Moleur F et al., 1996; Mislick KA and Baldeschwieler JD, 1996; Pitard B et al., 2002a) Cet excès de charges positives conduit certes à un transfert de gène efficace dans de nombreux types cellulaires mais il s'accompagne également d'une toxicité non négligeable même si les lipides de dernière génération ont permis d'améliorer considérablement ce dernier paramètre. De plus dans le cadre d'un transfert de gène *in vivo*, ces complexes chargés positivement vont interagir de manière non spécifique avec les membranes plasmiques des cellules non ciblées ainsi qu'avec les composants de la matrice extracellulaire ce qui limite fortement leur efficacité de transfection *in vivo* (Behr JP et al., 1989; Felgner JH et al., 1994). Pour améliorer l'efficacité et la spécificité de la transfection de ces vecteurs synthétiques cationiques, différentes équipes ont masqué les charges positives présentes à la surface des complexes par des molécules de PEG mais ont également greffé des motifs de ciblage aux extrémités des vecteurs cationiques pour assurer une reconnaissance spécifique ligand-récepteur. Si ces systèmes présentent une amélioration de transfection en présence du ligand, ils conduisent également à une transfection non spécifique importante.

Par conséquent au cours de cette thèse, j'ai étudié les relations entre les propriétés physico-chimiques et l'efficacité de transfection dans des hépatocytes primaires de rat de complexes vecteurs/ADN correspondant à un nouvel assemblage multimodulaire. L'étude de ces relations structure/fonction constitue un processus clé pour concevoir l'assemblage le plus efficace en terme d'activité biologique selon la variation des modules le composant.

Les différents systèmes multimodulaires que j'ai développé sont composés d'un cœur condensé d'ADN et d'une couronne périphérique de stabilisateurs stériques ioniques ou non ioniques fonctionnalisés par des motifs de ciblage (Letrou-Bonneval E et al., 2008). Pour former le cœur condensé des particules constituant le premier module, nous avons utilisé différents lipides cationiques, le BGTC qui est constitué de deux groupements guanidinium et d'une chaîne de cholestérol correspondant respectivement à la tête polaire et à la queue hydrophobe du lipide ainsi que la DOSP qui est composée d'un aminoglycoside lié à deux chaînes grasses insaturées par un bras succinyl. Ils ont été préparés sous forme de liposomes en présence d'un

co-lipide neutre, la DOPE, mais également sous forme de micelles pour la DOSP. Contrairement aux lipoplexes classiques formés à un rapport de charge lipide cationique/ADN élevé, ces lipides cationiques ont été complexés à l'ADN à un rapport de charge proche de l'électroneutralité (BGTC/DOPE-ADN, DOSP/DOPE-ADN et DOSP-ADN +/- 2) afin de s'affranchir des interactions non spécifiques avec les membranes cellulaires et les protéines anioniques présentes dans le milieu de transfection. Cependant, à ce faible rapport de charge, l'absence de répulsion électrostatique conduit à la formation de complexes lipide cationique/ADN instables colloïdalement, nécessitant l'ajout d'un second module de stabilisation. Nous avons donc utilisé des copolymères à blocs amphiphiles ioniques (704) et non ioniques (F68 et F108), comme stabilisateurs stériques. L'association de ces deux premiers modules permet d'obtenir un système neutre et stable. Afin de lui conférer des propriétés transfectantes, des résidus galactosyles servant de motifs de ciblage ont été greffés aux extrémités distales des copolymères à blocs pour cibler spécifiquement le récepteur aux asialoglycoprotéines qui est présent à la surface des hépatocytes via une reconnaissance cellulaire ligand-récepteur.

La plupart des polymères cationiques galactosylés (PEI-gal et PLL-gal) ont été synthétisés par voie chimique et présentent un faible taux d'incorporation du galactose (Bettinger T et al., 1999; Midoux P et al., 1993; Nishikawa M et al., 1998; Sagara K and Kim SW, 2002; Zanta MA et al., 1997). En effet, la fonctionnalisation directe du PEI par amination réductrice entre le PEI et les résidus galactosyles conduit au mieux à 5% de galactosylation sur l'ensemble des fonctions amines du polymère (Bettinger T et al., 1999; Sagara K and Kim SW, 2002; Zanta MA et al., 1997). Par conséquent, pour améliorer l'étape de greffage des résidus galactosyles par rapport à celui obtenu avec les polymères cationiques, nous avons développé deux stratégies de synthèse. Ces synthèses consistent au couplage des résidus galactosyles sur les copolymères à blocs par voie enzymatique ou par voie chimique.

La fonctionnalisation de l'ensemble des stabilisateurs stériques par voie enzymatique ou chimique a conduit à un taux d'incorporation des résidus galactosyles compris entre 25 et 65%. La méthode de greffage par voie enzymatique présente de nombreux avantages, de par sa simplicité et son originalité, mais le mécanisme d'action de ces enzymes ne permet pas d'obtenir des taux d'incorporation des résidus galactosyles supérieurs à 25%. La réaction de transglycosylation est cependant difficile à maîtriser car l'intermédiaire glycosyl-

enzyme formé peut également réagir avec une molécule d'eau plutôt qu'avec l'accepteur et donner ainsi le produit d'hydrolyse (Spangenberg P et al., 2000). La réaction de transglycosylation est donc limitée par la compétition entre les deux nucléophiles (l'eau et le stabilisateur stérique). De plus, la réaction d'hydrolyse peut affecter les produits de transglycosylation qui deviennent alors de nouveaux substrats pour l'enzyme. L'enzyme peut alors couper la liaison glycosidique formée conduisant ainsi à la libération du copolymère à blocs de départ (Chiffolleau-Giraud V et al., 1999). Concernant le 704, le greffage par voie enzymatique n'a pas fonctionné ce qui a nécessité le développement d'une nouvelle approche de greffage. La synthèse par voie chimique semble être la mieux adaptée pour la fonctionnalisation du stabilisateur stérique ionique car elle conduit à des taux d'incorporation des résidus saccharidiques pouvant atteindre 65% sur le 704. De plus, elle a permis d'améliorer le taux d'incorporation des résidus glycosyles sur les stabilisateurs stériques non ioniques par rapport à ceux obtenus par voie enzymatique. Cependant, les réactions de glycosylation chimique peuvent encore être optimisées en jouant sur le nombre d'équivalents de  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  ainsi que sur la concentration des composés activés (**7**, **10**) disponibles par fonctions OH distales des copolymères à blocs. De plus, les réactions de galactosylation chimique ne modifient pas la distribution des masses moléculaires moyennes des copolymères à blocs.

Une fois les copolymères à blocs galactosylés obtenus, les études physico-chimiques de différents systèmes multimodulaires ont été réalisées. Ces études ont permis de définir les rapports stabilisateurs stériques/ADN nécessaires à la stabilisation colloïdale des différents complexes lipide cationique/ADN formés à l'électroneutralité pour conduire à la formation de quatre systèmes multimodulaires. Ces systèmes correspondent aux lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal, DOSP/DOPE-ADN/F108-gal, DOSP/DOPE-ADN/704-gal et DOSP-ADN/704-gal. Au cours du développement de ces différents systèmes, nous avons pu observer que la stabilité physico-chimique des particules, déterminante pour une transfection efficace, dépendait de la nature et de l'organisation structurale du premier module ainsi que de la nature des stabilisateurs stériques composant le second module.

En effet, le F108 galactosylé assure la stabilisation colloïdale des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN et DOSP/DOPE-ADN mais pas de celle des lipoplexes DOSP-ADN. De même, le 704-gal ne permet pas de stabiliser colloïdalement les lipoplexes

BGTC/DOPE-ADN contrairement aux cœurs d'ADN condensé par les liposomes DOSP/DOPE et les micelles DOSP.

Les stabilisateurs stériques F108-gal et 704-gal conduisent après stabilisation colloïdale des lipoplexes formés à l'électroneutralité à des particules d'environ 300 nm de diamètre alors que les stabilisateurs stériques non galactosylés permettent de former des particules de plus petite taille de l'ordre de 150 nm de diamètre (Tableau 4). Le même phénomène d'augmentation de taille en présence de galactose est observé après stabilisation des complexes DOSP-ADN par le 704-gal bien que la taille des particules obtenues soit inférieure à celle obtenue avec les cœurs condensé d'ADN formés à partir des liposomes BGTC/DOPE et DOSP/DOPE. La même observation a été réalisée avec le PEI-gal qui forme avec l'ADN des complexes de plus grande taille que celle obtenue avec le PEI non fonctionnalisé (Bettinger T et al., 1999). Par conséquent, il semblerait que la présence du galactose modifie les propriétés physico-chimiques natives des vecteurs. Pourtant dans notre cas, bien que le F108-gal entraîne une augmentation de la taille des particules formées, il ne perturbe pas les interactions entre l'ADN et les liposomes. En effet, des études de microscopie par cryo-TEM ont montré que les liposomes BGTC/DOPE gardent une organisation structurale lamellaire en présence de F108-gal. Bien que la taille des lipoplexes formés en présence de F108-gal ou de F108 soit différente, ils présentent une organisation supramoléculaire similaire.

Les différents systèmes multimodulaires présélectionnés suivant leurs caractéristiques physico-chimiques ont pu être testés *in vitro* sur des hépatocytes primaires présentant le ASPGR à leur surface.

Les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal et DOSP/DOPE-ADN/F108-gal conduisant à la meilleure efficacité de transfection des hépatocytes primaires, ont été formés à un rapport de charge BGTC/DOPE-ADN et DOSP/DOPE-ADN de 2 ainsi qu'à un rapport F108-gal/ADN (w/w) de 300.

De plus, les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal présentent une forte labilité qui semble contribuer au désassemblage intracellulaire des complexes vecteur/ADN, facilitant ainsi le relargage cytoplasmique des molécules d'ADN et conduiront ainsi à une meilleure efficacité de transfection. En effet, nous avons constaté que les lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal présentaient une certaine labilité qui a été mise en évidence par électrophorèse sur gel d'agarose où une partie des molécules d'ADN était relarguée dans le gel. Ce phénomène n'étant pas observé par les

mesures de fluorescence du BET en solution et ces complexes présentant une efficacité de transfection non affectée, nous avons émis l'hypothèse que la migration des molécules d'ADN pourrait être due à la formation d'interactions non covalentes de type Van der Waals. Des liaisons hydrogènes et dipolaires pourraient être également engagées entre les résidus galactosyles présents dans le gel d'agarose et ceux greffés aux fonctions OH distales du F108. Par conséquent sous l'application d'un champ électrique, les interactions non covalentes seraient amplifiées entraînant ainsi la déstabilisation des lipoplexes galactosylés.

En revanche, si les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN stabilisés par le 704-gal ne conduisent pas à une transfection efficace, les lipoplexes DOSP-ADN/704-gal permettent eux de transfecter les hépatocytes.

Cette différence de transfection pourrait être expliquée par une association légèrement moins forte entre les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN et le 704-gal. En effet, lors de la caractérisation physico-chimique du système multimodulaire DOSP/DOPE-ADN/704-gal, nous avons montré que les mesures de fluorescence du BET en solution augmentaient légèrement avec le rapport 704-gal/ADN (w/w) bien qu'aucune molécule d'ADN ne migraient dans le gel agarose pendant l'expérience d'électrophorèse (Figure 49). Cependant, les puits où avaient été déposés les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/704-gal étaient plus fluorescents que ceux contenant les lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formés au rapport de charge de 2, ce qui pourrait être due à une perturbation de la complexation de l'ADN par le lipide cationique à cause de la charge positive portée par le motif central éthylène diamine constituant le 704. Ainsi lors de la transfection, une partie des molécules de 704-gal pourrait être dissociée du cœur condensé d'ADN limitant la capacité de ciblage du stabilisateur stérique galactosylé. La présentation des motifs galactosyles à la surface des lipoplexes seraient donc moins importante qu'avec les autres systèmes multimodulaires galactosylés ce qui pourrait expliquer la faible efficacité de transfection des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN/704-gal. En effet, l'affinité du ASPGR aux particules galactosylées dépend des résidus galactose présents à leur surface (Ashwell G and Harford J, 1982; Kawakami S *et al.*, 1998; Niidome T *et al.*, 2000).

Les trois systèmes multimodulaires galactosylés stables colloïdalement décrits dans cette thèse, BGTC/DOPE-ADN/F108-gal, DOSP/DOPE-ADN/F108-gal et DOSP-ADN/704-gal sont capables de conduire à une nette amélioration de



l'efficacité de transfection des hépatocytes primaires par rapport aux mêmes particules non galactosylées mais également aux lipoplexes fortement chargés positivement, et ce d'autant plus lorsque le rapport stabilisateur stérique galactosylé/ADN (w/w) augmente. Nous avons également mis en évidence, pour un même système multimodulaire, l'importance de la longueur du stabilisateur stérique galactosylé qui joue sur l'efficacité de transfection des systèmes multimodulaires de par sa capacité à être accessible et reconnu par le ASPGR. En effet, les stabilisateurs stériques de faible poids moléculaire composant le système multimodulaire, comme le F68, conduisent à un transfert de gène moins efficace. Pourtant le cœur condensé DOSP-ADN stabilisé par le 704-gal qui présente une masse moléculaire bien inférieure à celle du F68, parvient à transférer de manière significative les hépatocytes primaires. Par conséquent, bien que le 704 présente un taux de galactosylation supérieur à celui des stabilisateurs stériques non ioniques, il semblerait que la nature des stabilisateurs stériques utilisés soit impliquée dans le potentiel de transfert de gène de ces systèmes. Les copolymères à blocs ioniques et non ioniques sont différents de par le nombre d'OE les constituant, le F108 et le F68 sont composés de 80% OE alors que le 704 présente 40% d'OE. De plus, le 704 possède un caractère ionique de par la charge positive portée par le motif central éthylène diamine le constituant, alors que le F68 et le F108 sont des copolymères à blocs non ioniques. Ainsi ces différences de structure pourraient être fortement impliquées dans l'efficacité de transfection de ces systèmes multimodulaires mais également au niveau de leur assemblage physico-chimique. En effet, les copolymères à blocs ioniques et non ioniques ne parviennent pas à stabiliser colloïdalement les mêmes cœurs condensés d'ADN. Cette différence peut également être étroitement liée à la nature du lipide cationique utilisé pour complexer l'ADN.

Pour l'ensemble des trois systèmes multimodulaires décrits précédemment, seules les particules équipées de galactose conduisent à une transfection efficace des hépatocytes primaires. Les systèmes multimodulaires non galactosylés sont incapables de transférer les hépatocytes contrairement aux contrôles généralement utilisés dans la littérature qui conduisent à une transfection résiduelle non spécifique des cellules due aux charges positives encore présentes à la surface des particules (Bettinger T *et al.*, 1999; Frisch B *et al.*, 2004; Gaucheron J *et al.*, 2001; Han J and Yeom Y I, 2000; Kawakami S *et al.*, 1998; Midoux P *et al.*, 1993; Morimoto K *et al.*,

2003; Zanta MA *et al.*, 1997). Ces systèmes semblent donc être internalisés dans les hépatocytes primaires de rat par endocytose spécifique via une reconnaissance ligand-récepteur. Cette hypothèse a été confirmée après transfection du système multimodulaire galactosylé BGTC/DOPE-ADN/F108-gal sur différentes lignées humaines d'hépatocytes comme les cellules HepG2, IHH, HuH7 et Hep3B qui sont plus communément utilisées pour le ciblage spécifique du ASPGR. Encore une fois, seules les particules présentant le motif de ciblage conduisent à une transfection efficace des hépatocytes en culture.

Par conséquent, j'ai ensuite caractérisé les propriétés de ciblage du système multimodulaire BGTC/DOPE-ADN/F108-gal afin de s'assurer de son mécanisme d'internalisation dans les hépatocytes par la reconnaissance galactose-ASPGR. Pour cela des molécules compétitrices, capables de se lier au ASPGR telles que du galactose libre à différentes concentrations et des particules multimodulaires galactosylées identiques au système testé mais formées avec un plasmide vide, ont été ajoutées au milieu de transfection.

La présence de galactose libre dans le milieu de transfection des hépatocytes primaires inhibe l'efficacité de transfection des lipoplexes galactosylés, mettant ainsi en évidence la compétition des particules galactosylées avec le galactose libre au niveau de la reconnaissance ligand-récepteur. Cependant, l'inhibition totale de la transfection n'est pas atteinte et ce même pour des concentrations élevées de galactose libre (0,5 M), ce qui signifie que le système multimodulaire présente de nombreuses unités de galactose à sa surface entraînant des effets d'avidité. En effet, il a été montré dans la littérature que les vecteurs présentant une forte densité de galactose ont une meilleure affinité pour le récepteur et conduisent donc à une meilleure efficacité de transfection (Niidome T *et al.*, 2000) grâce au phénomène d'avidité car les ASGPR sont très proches les uns des autres (Rensen PC *et al.*, 2001). Ainsi, les résidus galactose peuvent être reconnus par plusieurs ASPGR et être ainsi internalisés plus rapidement. Par conséquent, le ciblage du ASGPR nécessite une certaine densité de ligand à la surface des complexes vecteur/ADN pour assurer une transfection optimale. J'ai donc estimé la densité de galactose à la surface des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal en admettant que le nombre de stabilisateurs stériques présents par unité de surface des lipoplexes est de 338 nmol/cm<sup>2</sup> selon la formule  $(n/N)/S$  où n est le nombre de moles de stabilisateurs

stériques en solution (40,6 nmol), N correspond au nombre de lipoplexes en solution ( $1,25 \times 10^8$ ) et S représente la surface d'un lipoplexe ( $9,6 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ ). Par conséquent, ces lipoplexes contiennent 135 nmol de galactose/cm<sup>2</sup>. Cette valeur est similaire avec celle calculée pour un autre système de transfert de gène préalablement décrit qui est capable de se fixer au ASPGR avec une forte affinité (Yin C *et al.*, 2003). Afin de confirmer la forte affinité des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal pour le ASPGR, des particules galactosylés identiques formées avec un plasmide vide ont été additionnées au milieu de transfection pour évaluer la compétition des deux systèmes au niveau du site de fixation du ASPGR. Ces particules étant identiques, elles présentent la même capacité à être reconnues par le ASPGR.

La présence de ces particules galactosylées contenant le plasmide vide, diminue de 80% l'expression du transgène des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal obtenue sans compétition. Par conséquent, en soustrayant la diminution non attendue de 30%, l'expression du transgène est donc diminuée de moitié ce qui indique qu'il y a bien compétition entre les deux types de particules galactosylées au niveau du site de fixation du ASPGR. Ces résultats corroborent ceux obtenus avec la compétition du galactose libre présent dans le milieu de transfection et confirment donc le mécanisme d'internalisation des lipoplexes BGTC/DOPE-ADN/F108-gal dans les hépatocytes primaires via le ASPGR.

Remy *et al.* ont également développé un système multimodulaire constitué de deux lipides; le premier porte les charges positives et le second, les résidus galactosyles triantennés. Le premier lipide est utilisé pour condenser l'ADN à un rapport de charge proche de l'électroneutralité puis le second qui présente des propriétés hydrophobes recouvre les lipoplexes afin de former une couronne périphérique des motifs de ciblage. Ce système multimodulaire entièrement lipidique permet de transfecter efficacement des hépatocytes en culture (Remy JS *et al.*, 1995). En revanche, Remy *et al.* ne parviennent pas à diminuer significativement l'efficacité de transfection de leur système en présence du ligand naturel du ASPGR, l'asialofetueine (Remy JS *et al.*, 1995). De plus contrairement à notre système multimodulaire galactosylé, l'assemblage supramoléculaire galactosylé proposé par Remy *et al.* n'a pas été caractérisé physico-chimiquement ainsi il se pourrait que son internalisation au sein des cellules HepG2 implique un mécanisme différent de celui de la reconnaissance cellulaire des particules par le ASPGR.

Les systèmes multimodulaires développés au cours de cette thèse étant proche de l'électroneutralité, ils pourraient être utilisés dans le cadre d'un transfert de gène *in vivo* par voie systémique afin de cibler spécifiquement le foie pour traiter de nombreuses pathologies génétiques et métaboliques. En effet, la neutralité des lipoplexes galactosylés leur permettrait de passer inaperçus dans les fluides biologiques et ainsi d'éviter les interactions non spécifiques avec les composants du sang et de la matrice extracellulaire ainsi qu'avec les membranes cellulaires des tissus non ciblés mais également avec les cellules phagocytaires de l'organisme. Ces systèmes multimodulaires pourraient également être améliorés par greffage de résidus N-acétylgalactosamine à la place des résidus galactose, car ils présentent une meilleure affinité pour le ASPGR ce qui permettrait encore d'optimiser le potentiel de transfert de gène de nos systèmes.

Ils pourraient également être adaptés pour transfecter d'autres types cellulaires par reconnaissance spécifique ligand-récepteur en modifiant les ligands greffés aux extrémités des copolymères à blocs par d'autres stratégies de synthèse telle que la click-chemistry mieux adaptée à la structure des nouveaux motifs de ciblage envisagés. Des résidus folate et transferrine ainsi que des peptides RDG pourraient être couplés aux copolymères à blocs pour cibler les tissus tumoraux après injection systémique. D'autres types d'acides nucléiques tels que les siRNA (small-interfering RNA) pourraient également être délivrés afin d'inhiber l'expression d'un gène dont la surexpression peut être à l'origine de maladies génétiques comme PCSK9 dans le cadre de l'hypercholestérolémie familiale.

### ***Optimisation du potentiel de transfert de gène des copolymères à blocs dans des poumons de souris***

Le transfert de gène non viral dans les poumons représente un enjeu majeur pour traiter de nombreuses pathologies pulmonaires acquises ou héréditaires comme la mucoviscidose. Les différents lipides et polymères cationiques utilisés pour le transfert de gène dans le tissu pulmonaire sont généralement des vecteurs très efficaces pour le transfert d'ADN dans des cellules en culture. Cependant, pour des applications *in vivo*, ils se sont avérés toxiques et peu efficaces (Ferrari S *et al.*, 1997; McLachlan G *et al.*, 1995). La forte densité de charges positives présente à la

surface des complexes vecteur/ADN limite leur administration *in vivo*, en raison de la présence des constituants anioniques du sérum ou de la matrice extracellulaire qui s'agrègent très rapidement avec ces complexes (Kang HC *et al.*, 2005). Pourtant, le transfert d'acides nucléiques dans les poumons peut présenter de nombreuses applications thérapeutiques comme, par exemple, le traitement de la mucoviscidose, de l'asthme, ou des cancers, mais il peut également être utilisé pour la sécrétion de protéine systémique. Actuellement, le vecteur synthétique le plus efficace pour transférer de l'ADN dans les poumons est l'homopolymère cationique PEI (Densmore CL *et al.*, 2000; Goula D *et al.*, 1998). Cependant, l'injection des complexes PEI/ADN induit une forte réaction inflammatoire dans les poumons qui se traduit par une importante obstruction des bronches ainsi que par un important infiltrat cellulaire au niveau de la zone péri-bronchiale et des vaisseaux sanguins pulmonaires (Ruiz FE *et al.*, 2001; Zabner J *et al.*, 1997). Un système de vectorisation efficace, non invasif et non toxique nécessite réellement d'être développé pour cet organe car ce type de réaction inflammatoire observé avec le PEI n'est pas concevable dans un contexte pathologique comme la mucoviscidose où l'organe présente déjà d'importantes lésions.

Pour pallier le manque d'efficacité et la forte cytotoxicité de ces vecteurs synthétiques cationiques, une nouvelle classe de vecteurs synthétiques non toxiques, les copolymères à blocs amphiphiles ioniques et non ioniques, a été développée au sein de notre laboratoire pour le transfert de gène dans les poumons (Desigaux L *et al.*, 2005). Les copolymères à blocs non ioniques ne possèdent pas de groupements cationiques capables d'établir des interactions électrostatiques avec les phosphates de l'ADN, cependant nous avons supposé qu'ils pouvaient interagir avec l'ADN par des liaisons hydrogènes de Van der Waals ou bien par des interactions hydrophobes. Ces vecteurs présentent déjà forte efficacité de transfection au sein de nombreux organes, tels que le muscle squelettique ou le cœur. En effet, les copolymères à blocs formulés à de l'ADN conduisent à une nette augmentation de l'expression du gène rapporteur par rapport à l'ADN nu dans le muscle (Pitard B *et al.*, 2002b; Richard P *et al.*, 2005a; Richard P *et al.*, 2005b). D'autres études ont confirmé l'augmentation de l'expression d'un gène rapporteur ou thérapeutique lorsque l'ADN est complexé en présence de copolymères à blocs non ioniques (Lemieux P *et al.*, 2000; Liaw J *et al.*, 2001). L'injection intratrachéale de

ces vecteurs conduit à une forte expression du transgène dans le tissu pulmonaire et notamment au niveau des cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires.

L'optimisation du potentiel de transfert de gène de ces nouveaux vecteurs synthétiques par greffage d'un ligand à leurs extrémités permettrait d'augmenter l'efficacité de transfection en ciblant spécifiquement des cellules pulmonaires. De nombreux vecteurs synthétiques ont ainsi été substitués par des résidus glycosidiques comme le lactose ou le mannose qui sont reconnus spécifiquement par des récepteurs membranaires de type lectines présents à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Midoux P *et al.*, 1993; Monsigny M *et al.*, 1998).

Au cours de cette thèse je me suis donc intéressée dans une deuxième partie au développement d'un nouveau système de vectorisation synthétique galactosylé permettant d'améliorer le transfert de gène pulmonaire des copolymères à blocs. Dans un premier temps, nous avons décidé d'utiliser le système multimodulaire BGTC/DOPE-ADN/F108-gal qui a été développé précédemment dans cette thèse pour cibler spécifiquement les hépatocytes primaires, par endocytose récepteur-dépendant via la reconnaissance cellulaire galactose-ASPGR. En effet, le système multimodulaire est composé d'un cœur condensé d'ADN stabilisé par une couronne de copolymères à blocs amphiphiles dont les extrémités distales sont fonctionnalisées par des résidus galactosyles. Les copolymères à blocs amphiphiles étant une nouvelle classe de vecteurs efficaces pour le transfert de gène dans les poumons (Desigaux L *et al.*, 2005), le système multimodulaire galactosylé semblait être une approche prometteuse pour le transfert de gène pulmonaire spécifique. Cependant, ce système multimodulaire galactosylé conduit à une faible efficacité de transfection dans les poumons, qui est même très inférieure à celle obtenue avec les copolymères à blocs natifs. Le système multimodulaire galactosylé présente une taille de 300 nm de diamètre ce qui a peut-être pu limiter son internalisation dans les cellules épithéliales pulmonaires qui se situent au niveau de la membrane basale des poumons.

Pourtant différents systèmes glycosylés ont permis de transférer efficacement des cellules épithéliales des voies aériennes (Midoux P *et al.*, 1993; Monsigny M *et al.*, 1998). En effet, Grosse *et al.* ont développé un dérivé de PEI fonctionnalisé par des résidus lactosyles (PEI-lac) qui conduit à une nette augmentation de l'efficacité de transfection *in vitro* dans des cellules épithéliales des voies aériennes humaines par rapport à celle observée avec le PEI non substitué mais présente néanmoins encore

une certaine toxicité (Grosse S *et al.*, 2004). L'augmentation de l'expression du transgène est due à la présence du galactose. En effet, le lactose n'est pas le motif de ciblage car la fonctionnalisation chimique du PEI a entraîné l'ouverture de la première unité saccharidique du lactose, ne laissant ainsi plus que le galactose comme seul réel motif de ciblage des cellules épithéliales. Cependant, la toxicité du PEI *in vivo* limite son développement.

Par conséquent, nous avons décidé d'utiliser directement, les copolymères à blocs galactosylés comme seuls systèmes de vectorisation de l'ADN. L'efficacité de transfection des copolymères à blocs sera ainsi optimisée par le ciblage spécifique des cellules épithéliales pulmonaires grâce aux résidus galactosyles greffés à leurs extrémités. Pour confirmer l'approche du transfert de gène pulmonaire par les copolymères à blocs galactosylés, le gène rapporteur de la CAT a été formulé avec différents copolymères, le F68-gal, le F108-gal ainsi que le 704-gal à différentes concentrations puis injectés dans les poumons de souris par voie intratrachéale.

Les complexes 704-gal/ADN conduisent à trois fois plus d'expression du transgène par rapport aux complexes 704/ADN mais également à 22 fois plus par rapport aux autres complexes copolymères à blocs non galactosylés/ADN. En effet, les complexes 704-gal/ADN permettent d'obtenir une activité de la CAT très élevée comparée aux complexes F68-gal/ADN et F108-gal/ADN. Cette différence significative peut être expliquée par le taux d'incorporation des résidus galactosyles mais également par les différences de structure des copolymères à blocs. En effet, le 704-gal présente un taux d'incorporation du galactose de 65% contrairement au F68-gal et au F108-gal qui sont caractérisés respectivement par 34 et 44% de galactose greffé. De plus, le 704 possède un caractère légèrement ionique par rapport au F68 et au F108 ce qui lui confère peut-être un meilleur assemblage avec l'ADN en plus des interactions hydrophiles et hydrophobes liées à ses propriétés amphiphiles.

Par conséquent, il semblerait que le taux d'incorporation des résidus galactosyles ainsi que la nature du copolymère à blocs jouent un rôle important dans l'efficacité de transfection de ces nouveaux vecteurs galactosylés. Ainsi, plus le nombre de résidus galactosyles greffés augmente, plus l'expression du transgène est importante au sein du tissu pulmonaire. La présence du galactose semble donc augmenter le nombre de cellules épithéliales pulmonaires transfectées. En effet, cette nouvelle génération de vecteurs permet d'atteindre un maximum d'expression du transgène 7 jours après l'injection contrairement aux vecteurs cationiques qui conduisent à une expression

maximale du transgène 2 jours après injection dans les poumons (Densmore CL *et al.*, 2000). De plus, 10 jours après l'injection, le 704-gal permet encore de maintenir l'expression de la protéine CAT qui reste encore supérieure à celle obtenue avec le 704 non galactosylé. Dans le cas des complexes 704/ADN, ce type de profil d'expression peut s'expliquer par une transfection plus rapide de l'ADN plasmidique au noyau contrairement aux complexes 704-gal/ADN où une réserve d'ADN plasmidique semble s'être créée au sein de la cellule pour prolonger l'expression. Ainsi cet effet réservoir pourrait expliquer la nette augmentation de l'expression du transgène par rapport à J2. Ces résultats peuvent également suggérer que les copolymères à blocs galactosylés transfectent un autre type cellulaire que les copolymères à blocs parents.

De plus, l'administration par Microsprayer<sup>®</sup> des complexes 704-gal/ADN permet de souligner de manière encore plus évidente l'amélioration du potentiel de transfert de gène des copolymères à blocs parent, qui étaient déjà une classe de vecteurs synthétiques efficaces pour le transfert de gène pulmonaire. Le Microsprayer<sup>®</sup> permet une distribution des complexes 704-gal/ADN beaucoup plus importante et diffuse dans l'ensemble des poumons par rapport à celle obtenue avec les complexes 704/ADN. Par conséquent, la transfection des complexes 704-gal/ADN conduiraient à un plus grand nombre de cellules pulmonaires transfectées que les complexes 704/ADN. Cependant, il reste à déterminer le type de cellules ciblé par les complexes 704-gal/ADN. Des analyses histochimiques par immunomarquage du transgène devraient permettre de mettre en évidence les cellules qui ont reçu les complexes 704-gal/ADN.

Par conséquent, ces résultats indiquent que les copolymères à blocs galactosylés correspondent à une nouvelle génération de vecteurs synthétiques adaptés au transfert de gène pulmonaire, capable d'améliorer le potentiel de transfert de gène des vecteurs de la première génération quelque soit le mode d'administration dans des poumons de souris saines. De plus, cette nouvelle génération de vecteurs permet d'améliorer la cinétique d'expression du transgène avec un maximum d'activité 7 jours après l'injection contrairement aux copolymères à blocs parent. Par conséquent, de nouvelles perspectives pour le transfert de gène pulmonaire ciblé peuvent être envisagées en de nombreuses applications qui pourront être développées par exemple, pour différentes approches thérapeutiques de la mucoviscidose



### **Conclusion**

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

## **VI - BIBLIOGRAPHIE**

**BIBLIOGRAPHIE**

---

- Abdallah B, Hassan A, Benoist C, Goula D, Behr JP, and Demeneix BA (1996). A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther.* **7**, 1947-1954.
- Aiuti A, Slavin S, Aker M, *et al.* (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science.* **296**, 2410-2413.
- Allo JC, Midoux P, Merten M, Souil E, Lipecka J, Figarella C, Monsigny M, Briand P, and Fajac I (2000). Efficient gene transfer into human normal and cystic fibrosis tracheal gland serous cells with synthetic vectors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **22**, 166-175.
- Ambegia E, Ansell S, Cullis P, Heyes J, Palmer L, and MacLachlan I (2005). Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. *Biochim Biophys Acta.* **1669**, 155-163.
- André C, Niamke S, Faure A, Colas B, Bérot S, Larré C, Guéguen J, and Rabiller C (2004). New methods for chemo-enzymatic galactosidation of 2S rapeseed protein. *Protein J.* **23**, 247-254.
- Anwer K, Logan M, Tagliaferri F, *et al.* (2000). Synthetic glycopeptide-based delivery systems for systemic gene targeting to hepatocytes. *Pharm Res.* **17**, 451-459.
- Ashwell G, and Harford J (1982). Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem.* **51**, 531-554.
- Astafieva I, Maksimova I, Lukanidin E, Alakhov V, and Kabanov A (1996). Enhancement of the polycation-mediated DNA uptake and cell transfection with Pluronic P85 block copolymer. *FEBS Lett.* **389**, 278-280.
- Audouy S, and Hoekstra D (2001). Cationic lipid-mediated transfection in vitro and in vivo (review). *Mol Membr Biol.* **18**, 129-143.
- Balavoine S, Feldmann G, Lardeux B, and . (1993). Regulation of RNA degradation in cultured rat hepatocytes: effects of specific amino acids and insulin. *J Cell Physiol.* **156**, 56-62.
- 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.
- Batrakova EV, Li S, Alakhov VY, Miller DW, and Kabanov AV (2003). Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **304**, 845-854.

Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, Miller DW, Alakhov VY, and Kabanov AV (2001a). Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. *Br J Cancer*. **85**, 1987-1997.

Batrakova EV, Li S, Vinogradov SV, Alakhov VY, Miller DW, and Kabanov AV (2001b). Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J Pharmacol Exp Ther*. **299**, 483-493.

Beck SE, Laube BL, Barberena CI, Fischer AC, Adams RJ, Chesnut K, Flotte TR, and Guggino WB (2002). Deposition and expression of aerosolized rAAV vectors in the lungs of Rhesus macaques. *Mol Ther*. **6**, 546-554.

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

Belmont P, Aissaoui A, Hauchecorne M, Oudrhiri N, Petit L, Vigneron JP, Lehn JM, 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.

BENNETT HS, LUFT JH, and HAMPTON JC (1959). Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol*. **196**, 381-390.

Benns JM, Mahato RI, and Kim SW (2002). Optimization of factors influencing the transfection efficiency of folate-PEG-folate-graft-polyethylenimine. *J Control Release*. **79**, 255-269.

Berry MN, and Friend DS (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol*. **43**, 506-520.

Bettinger T, Remy JS, and P., E. (1999). Size reduction of galactosylated PEI/DNA complexes improves lectin-mediated gene transfer into hepatocytes. *Bioconjug Chem*. **10**, 558-561.

Bieber T, Meissner W, Kostin S, Niemann A, and Elsasser HP (2002). Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J Control Release*. **82**, 441-454.

Bies C, Lehr CM, and Woodley JF (2004). Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv Drug Deliv Rev*. **56**, 425-435.

Blessing T, Kursa M, Holzhauser R, Kircheis R, and Wagner E (2001). Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. *Bioconjug Chem*. **12**, 529-537.

Boukhnikachvili T, Aguerre-Chariol O, Airiau M, Lesieur S, Ollivon M, and Vacus J (1997). Structure of in-serum transfecting DNA-cationic lipid complexes. *FEBS Lett*. **409**, 188-194.

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, and Behr JP (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.

Carmen IH (2001). A death in the laboratory: the politics of the Gelsinger aftermath. *Mol Ther.* **3**, 425-428.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Yates F, de Villartay JP, Le Deist F, and Fischer A (2001). Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *J Gene Med.* **3**, 201-206.

Chang SF, Chang HY, Tong YC, Chen SH, Hsiao FC, Lu SC, and Liaw J (2004). Nonionic polymeric micelles for oral gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther.* **15**, 481-493.

Chen Z, and Rand RP (1997). The influence of cholesterol on phospholipid membrane curvature and bending elasticity. *Biophys J.* **73**, 267-276.

Chiffolleau-Giraud V, Spangenberg P, Dion M, and Rabiller C (1999). Transferase Activity of a bgr-Glycosidase from *Thermus thermophilus*: Specificities and Limits - Application to the Synthesis of bgr-[1arr3]-Disaccharides. *Eur J Org Chem.* 757-763.

Choi JS, MacKay JA, and Szoka FC Jr (2003). Low-pH-sensitive PEG-stabilized plasmid-lipid nanoparticles: preparation and characterization. *Bioconjug Chem.* **14**, 420-429.

Choi YH, Liu F, Choi JS, Kim SW, and Park JS (1999). Characterization of a targeted gene carrier, lactose-polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine and its complex with plasmid DNA. *Hum Gene Ther.* **10**, 2657-2665.

Choi YH, Liu F, Park JS, and Kim SW (1998). Lactose-poly(ethylene glycol)-grafted poly-L-lysine as hepatoma cell-targeted gene carrier. *Bioconjug Chem.* **9**, 708-718.

Choi, Y.H., Liu, F., Kim, J.-S., Choi, Y.K., Park, J.S., and Kim, S.W. (1998). Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier. *Journal of Controlled Release.* **54**, 39-48.

Cockett MI (1999). Technology evaluation: cystic fibrosis therapy, Genzyme. *Curr Opin Mol Ther.* **1**, 279-283.

Conner SD, and Schmid SL (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* **422**, 37-44.

Cristiano RJ, Smith LC, Kay MA, Brinkley BR, and Woo SL (1993). Hepatic gene therapy: efficient gene delivery and expression in primary hepatocytes utilizing a conjugated adenovirus-DNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 11548-11552.

Danielsen S, Maurstad G, and Stokke BT (2005). DNA-polycation complexation and polyplex stability in the presence of competing polyanions. *Biopolymers.* **77**, 86-97.

- Davis ME (2002). Non-viral gene delivery systems. *Curr Opin Biotechnol.* **13**, 128-131.
- Dean DA, Machado-Aranda D, Blair-Parks K, Yeldandi AV, and Young JL (2003). Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung. *Gene Ther.* **10**, 1608-1615.
- Demeneix B, Behr J, Boussif O, Zanta MA, Abdallah B, and Remy J (1998). Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev.* **30**, 85-95.
- Demeneix B, and Behr JP (2005). Polyethylenimine (PEI). *Adv Genet.* **53**, 215-230.
- Densmore CL, Orson FM, Xu B, Kinsey BM, Waldrep JC, Hua P, Bhogal B, and Knight V (2000). Aerosol delivery of robust polyethyleneimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Mol Ther.* **1**, 180-188.
- Dentin R, Pégrier JP, Benhamed F, Fougelle F, Ferré P, Fauveau V, Magnuson MA, Girard J, and Postic C (2004). Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem.* **279**, 20314-20326.
- Deshpande MC, Davies MC, Garnett MC, Williams PM, Armitage D, Bailey L, Vamvakaki M, Armes SP, and Stolnik S (2004). The effect of poly(ethylene glycol) molecular architecture on cellular interaction and uptake of DNA complexes. *J Control Release.* **97**, 143-156.
- 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 JP, Lehn P, Lehn JM, and Pitard B (2007). Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 16534-16539.
- Di Stefano G, Busi C, Mattioli A, and Fiume L (1995). Selective delivery to the liver of antiviral nucleoside analogs coupled to a high molecular mass lactosaminated poly-L-lysine and administered to mice by intramuscular route. *Biochem Pharmacol.* **49**, 1769-1775.
- Diebold SS, Lehrmann H, Kursa M, Wagner E, Cotten M, and Zenke M (1999). Efficient gene delivery into human dendritic cells by adenovirus polyethylenimine and mannose polyethylenimine transfection. *Hum Gene Ther.* **10**, 775-786.
- Dishart KL, Denby L, George SJ, Nicklin SA, Yendluri S, Tuerk MJ, Kelley MP, Donahue BA, Newby AC, Harding T, and Baker AH (2003). Third-generation lentivirus vectors efficiently transduce and phenotypically modify vascular cells: implications for gene therapy. *J Mol Cell Cardiol.* **35**, 739-748.

- Drickamer K, and Taylor ME (1993). Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol.* **9**, 237-264.
- Dufès C, Uchegbu IF, and Schätzlein AG (2005). Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* **57**, 2177-2202.
- Dullenkopf W, Castro-Palomino JC, Manzoni L, and Schmidt RR (1996). N-trichloroethoxycarbonyl-glucosamine derivatives as glycosyl donors. *Carbohydr Res.* **296**, 135-147.
- Dunlap DD, Maggi A, Soria MR, and Monaco L (1997). Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3095-3101.
- Dykes GM, Brierley LJ, Smith DK, McGrail PT, and Seeley G (2001). Supramolecular solubilisation of hydrophilic dyes by using individual dendritic branches. *Chemistry.* **7**, 4730-4739.
- Erbacher P, Bettinger T, Belguise-Valladier P, Zou S, Coll JL, Behr JP, and Remy JS (1999a). Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *J Gene Med.* **1**, 210-222.
- Erbacher P, Remy JS, and Behr JP (1999b). Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther.* **6**, 138-145.
- Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan AM, and Remy JS (1998). Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res.* **15**, 1332-1339.
- Erlandsson B, Wittgren B, and Brinkmalm G (2003). Development of a size exclusion chromatography method for the determination of molar mass for poloxamers. *J Pharm Biomed Anal.* **31**, 845-858.
- Fajac I, Briand P, Monsigny M, and Midoux P (1999). Sugar-mediated uptake of glycosylated polylysines and gene transfer into normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther.* **10**, 395-406.
- Fajac I, Thévenot G, Bédouet L, Danel C, Riquet M, Merten M, Figarella C, Dall'Ava-Santucci J, Monsigny M, and Briand P (2003). Uptake of plasmid/glycosylated polymer complexes and gene transfer efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J Gene Med.* **5**, 38-48.
- Farhood, H., Bottega, R., Epand, R.M., and Huang, L. (1992). Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* **1111**, 239-246.
- Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, 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 PL, Barenholz Y, Behr JP, *et al.* (1997). Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther.* **8**, 511-512.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, and Danielsen M (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**, 7413–7417.
- Felgner PL, and Ringold GM (1989). Cationic liposome-mediated transfection. *Nature.* **337**, 387-388.
- Ferrari S, Moro E, Pettenazzo A, Behr J P, Zacchello F, and Scarpa M (1997). ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **4**, 1100-1106.
- Fischer A, Hacein-Bey S, Le Deist F, De Saint Basile G, and Cavazzana-Calvo M (2001). Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Adv Exp Med Biol.* **495**, 199-204.
- Fischer AC, Smith CI, Cebotaru L, Zhang X, Askin FB, Wright J, Guggino SE, Adams RJ, Flotte T, and Guggino WB (2007). Expression of a truncated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an AAV5-pseudotyped vector in primates. *Mol Ther.* **15**, 756-763.
- Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsässer HP, and Kissel T (1999). A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res.* **16**, 1273-1279.
- Frisch B, Carrière M, Largeau C, Mathey F, Masson C, Schuber F, Scherman D, and Escriou V (2004). A new triantennary galactose-targeted PEGylated gene carrier, characterization of its complex with DNA, and transfection of hepatoma cells. *Bioconjug Chem.* **15**, 754-764.
- Gao X, and Huang L (1991). A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **179**, 280-285.
- Gao X, and Huang L (1995). Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther.* **2**, 710-722.
- Gaucheron J, Santaella C, and Vierling P (2001). In vitro gene transfer with a novel galactosylated spermine bolaamphiphile. *Bioconjug Chem.* **12**, 569-575.
- Gebhart CL, Sriadibhatla S, Vinogradov S, Lemieux P, Alakhov V, and Kabanov AV (2002). Design and formulation of polyplexes based on pluronic-polyethyleneimine conjugates for gene transfer. *Bioconjug Chem.* **13**, 937-944.
- Gershon H, Ghirlando R, Guttman SB, and Minsky A (1993). Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry.* **32**, 7143-7151.



- Golan R, Pietrasanta LI, Hsieh W, and Hansma HG (1999). DNA toroids: stages in condensation. *Biochemistry*. **38**, 14069-14076.
- Goula D, Remy JS, Erbacher P, Wasowicz M, Levi G, Abdallah B, and Demeneix BA (1998). Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther*. **5**, 712-717.
- Greenfield RS, Kaneko T, Daues A, Edson MA, Fitzgerald KA, Olech LJ, Grattan JA, Spitalny GL, and Braslawsky GR (1990). Evaluation in vitro of adriamycin immunoconjugates synthesized using an acid-sensitive hydrazone linker. *Cancer Res*. **50**, 6600-6607.
- Grosse S, Aron Y, Honoré I, Thévenot G, Danel C, Roche AC, Monsigny M, and Fajac I (2004). Lactosylated polyethylenimine for gene transfer into airway epithelial cells: role of the sugar moiety in cell delivery and intracellular trafficking of the complexes. *J Gene Med*. **6**, 345-356.
- Grosse S, Aron Y, Thévenot G, François D, Monsigny M, and Fajac I (2005). Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations. *J Gene Med*. **7**, 1275-1286.
- Grosse S, Tremeau-Bravard A, Aron Y, Briand P, and Fajac I (2002). Intracellular rate-limiting steps of gene transfer using glycosylated polylysines in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Gene Ther*. **9**, 1000-1007.
- Guo W, Hinkle GH, and Lee RJ (1999). <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-folate: a novel receptor-based targeted radiopharmaceutical for tumor imaging. *J Nucl Med*. **40**, 1563-1569.
- Guo W, and Lee RJ (2001). Efficient gene delivery via non-covalent complexes of folic acid and polyethylenimine. *J Control Release*. **77**, 131-138.
- Haensler J, and Szoka FC Jr (1993). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem*. **4**, 372-379.
- Han J, and Yeom Y I (2000). Specific gene transfer mediated by galactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Int J Pharm*. **202**, 151-160.
- Hashida M, Nishikawa M, Yamashita F, and Takakura Y (2001). Cell-specific delivery of genes with glycosylated carriers. *Adv Drug Deliv Rev*. **52**, 187-196.
- Hejazi R, and Amiji M (2003). Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *J Control Release*. **89**, 151-165.
- Hildebrandt IJ, Iyer M, Wagner E, and Gambhir SS (2003). Optical imaging of transferrin targeted PEI/DNA complexes in living subjects. *Gene Ther*. **10**, 758-764.
- Hirsch-Lerner D, Zhang M, Eliyahu H, Ferrari ME, Wheeler CJ, and Barenholz Y (2005). Effect of "helper lipid" on lipoplex electrostatics. *Biochim Biophys Acta*. **1714**, 71-84.

- Hong K, Zheng W, Baker A, and Papahadjopoulos D (1997). Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery. *FEBS Lett.* **400**, 233-237.
- Hwang SJ, and Davis ME (2001). Cationic polymers for gene delivery: designs for overcoming barriers to systemic administration. *Curr Opin Mol Ther.* **3**, 183-191.
- Hyvönen Z, Rönkkö S, Toppinen MR, Jääskeläinen I, Plotniece A, and Urtti A (2004). Dioleoyl phosphatidylethanolamine and PEG-lipid conjugates modify DNA delivery mediated by 1,4-dihydropyridine amphiphiles. *J Control Release.* **99**, 177-190.
- Illum L, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, Fisher AN, and Davis SS (2001). Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* **51**, 81-96.
- Ingram DA, Forman MB, and Murray JJ (1992). Phagocytic activation of human neutrophils by the detergent component of fluosol. *Am J Pathol.* **140**, 1081-1087.
- Kabanov A, Zhu J, and Alakhov V (2005). Pluronic Block Copolymers for Gene Delivery. *Adv Genet.* **53**, 231-261.
- Kabanov AV, Batrakova EV, and Alakhov VY (2002). Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release.* **82**, 189-212.
- Kabanov AV, Batrakova EV, Sriadibhatla S, Yang Z, Kelly DL, and Alakov VY (2005). Polymer genomics: shifting the gene and drug delivery paradigms. *J Control Release* **101**, 259-271.
- Kabanov AV, and Kabanov VA (1995). DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconjug Chem.* **6**, 7-20.
- Kang HC, Lee M, and Bae YH (2005). Polymeric gene carriers. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* **15**, 317-342.
- Katayose S, and Kataoka K (1997). Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. *Bioconjug Chem.* **8**, 702-707.
- Katsel PL, and Greenstein RJ (2000). Eukaryotic gene transfer with liposomes: effect of differences in lipid structure. *Biotechnol Annu Rev.* **5**, 197-220.
- Kawakami S, Fumoto S, Nishikawa M, Yamashita F, and Hashida M (2000). In vivo gene delivery to the liver using novel galactosylated cationic liposomes. *Pharm Res.* **17**, 306-313.
- Kawakami S, Yamashita F, Nishikawa M, Takakura Y, and Hashida M (1998). Asialoglycoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated cationic liposomes. *Biochem Biophys Res Commun.* **252**, 78-83.

- Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, and Danos O (2001). Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med.* **3**, 135-144.
- Kim H, and Muller WJ (1999). The role of the epidermal growth factor receptor family in mammary tumorigenesis and metastasis. *Exp Cell Res.* **253**, 78-87.
- Kircheis R, Blessing T, Brunner S, Wightman L, and Wagner E (2001a). Tumor targeting with surface-shielded ligand--polycation DNA complexes. *J Control Release.* **72**, 165-170.
- Kircheis R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Felzmann T, Buchberger M, and Wagner E (1997). Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther.* **4**, 409-418.
- Kircheis R, Schüller S, Brunner S, Ogris M, Heider KH, Zauner W, and Wagner E (1999). Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J Gene Med.* **1**, 111-120.
- Kircheis R, Wightman L, Schreiber A, Robitza B, Rössler V, Kursa M, and Wagner E (2001b). Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther.* **8**, 28-40.
- Kircheis R, Wightman L, and Wagner E (2001c). Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev.* **53**, 341-358.
- Klink DT, Glick MC, and Scanlin TF (2001). Gene therapy of cystic fibrosis (CF) airways: a review emphasizing targeting with lactose. *Glycoconj J.* **18**, 731-740.
- Knowles MR, Hohneker KW, Zhou Z, Olsen JC, Noah TL, Hu PC, Leigh MW, Engelhardt JF, Edwards LJ, Jones KR, and et al (1995). A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med.* **333**, 823-831.
- Kollen WJ, Midoux P, Erbacher P, Yip A, Roche AC, Monsigny M, Glick MC, and Scanlin TF (1996). Gluconoylated and glycosylated polylysines as vectors for gene transfer into cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther.* **7**, 1577-1586.
- Kollen WJ, Mulberg AE, Wei X, Sugita M, Raghuram V, Wang J, Foskett JK, Glick MC, and Scanlin TF (1999a). High-efficiency transfer of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA into cystic fibrosis airway cells in culture using lactosylated polylysine as a vector. *Hum Gene Ther.* **10**, 615-622.
- Kollen WJ, Schembri FM, Gerwig GJ, Vliegenthart JF, Glick MC, and Scanlin TF (1999b). Enhanced efficiency of lactosylated poly-L-lysine-mediated gene transfer into cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **20**, 1081-1086.
- Koltover I, Salditt T, Rädler JO, and Safinya CR (1998). An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science.* **281**, 78-81.

- Köping-Höggård M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Vårnum KM, and Artursson P (2001). Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther.* **8**, 1108-1121.
- Kukowska-Latallo JF, Bielinska AU, Johnson J, Spindler R, Tomalia DA, and Baker JR Jr (1996). Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 4897-4902.
- Kunath K, von Harpe A, Fischer D, Petersen H, Bickel U, Voigt K, and Kissel T (2003). Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J Control Release.* **89**, 113-125.
- Kuo JH (2003). Effect of Pluronic-block copolymers on the reduction of serum-mediated inhibition of gene transfer of polyethyleneimine-DNA complexes. *Biotechnol Appl Biochem.* **37**, 267-271.
- Kursa M, Walker GF, Roessler V, Ogris M, Roedl W, Kircheis R, and Wagner E (2003). Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer. *Bioconjug Chem.* **14**, 222-231.
- Kwoh DY, Coffin CC, Lollo CP, *et al.* (1999). Stabilization of poly-L-lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver. *Biochim Biophys Acta.* **1444**, 171-190.
- Labat-Moleur F, Steffan AM, Brisson C, Perron H, Feugeas O, Furstenberger P, Oberling F, Brambilla E, and Behr J P (1996). An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther.* **3**, 1010-1017.
- Lee ER, Marshall J, Siegel CS, *et al.* (1996). Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Hum Gene Ther.* **7**, 1701-1717.
- Lee M, and Kim SW (2005). Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery. *Pharm Res.* **22**, 1-10.
- 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.
- Letrou-Bonneval E, Chèvre R, Lambert O, Costet P, André C, Tellier C, and Pitard B (2008). Galactosylated multimodular lipoplexes for specific gene transfer into primary hepatocytes. *J Gene Med.* **10**, 1198-1209.
- Li S, and Ma Z (2001). Nonviral gene therapy. *Curr Gene Ther.* **1**, 201-226.

Liaw J, Chang SF, and Hsiao FC (2001). In vivo gene delivery into ocular tissues by eye drops of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) polymeric micelles. *Gene Ther.* **8**, 999-1004.

Liu D, Ren T, and Gao X (2003). Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem.* **10**, 1307-1315.

Liu G, Molas M, Grossmann GA, Pasumarthy M, Perales JC, Cooper MJ, and Hanson RW (2001). Biological properties of poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation. *J Biol Chem.* **276**, 34379-34387.

Lu Y, and Low PS (2002). Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv Drug Deliv Rev.* **54**, 675-693.

Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, and Göpferich A (2005). Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm.* **60**, 247-266.

Mahato RI, Kawabata K, Nomura T, Takakura Y, and Hashida M (1995). Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of plasmid DNA/cationic liposome complexes. *J Pharm Sci.* **84**, 1267-1271.

Maillard L, Van Belle E, Tio FO, Rivard A, Kearney M, Branellec D, Steg PG, Isner JM, and Walsh K (2000). Effect of percutaneous adenovirus-mediated Gax gene delivery to the arterial wall in double-injured atheromatous stented rabbit iliac arteries. *Gene Ther.* **7**, 1353-1361.

Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, August JT, and Leong KW (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release.* **70**, 399-421.

Mao Y, Thompson MJ, Wang Q, and Tsai EW (2004). Quantitation of poloxamers in pharmaceutical formulations using size exclusion chromatography and colorimetric methods. *J Pharm Biomed Anal.* **35**, 1127-1142.

March J (1992). *Advanced Organic Chemistry : Reactions, Mechanisms, and Structure*, 4<sup>ème</sup> éd., (John Wiley & Sons), **1495 p.**

Maruta F, Parker AL, Fisher KD, Hallissey MT, Ismail T, Rowlands DC, Chandler LA, Kerr DJ, and Seymour LW (2002). Identification of FGF receptor-binding peptides for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **9**, 543-552.

Maruyama A, Katoh M, Ishihara T, and Akaike T (1997). Comb-type polycations effectively stabilize DNA triplex. *Bioconjug Chem.* **8**, 3-6.

McLachlan G, Davidson DJ, Stevenson BJ, Dickinson P, Davidson-Smith H, Dorin JR, and Porteous DJ (1995). Evaluation in vitro and in vivo of cationic liposome-expression construct complexes for cystic fibrosis gene therapy. *Gene Ther.* **2**, 614-622.

- Meier M, Bider MD, Malashkevich VN, Spiess M, and Burkhard P (2000). Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor. *J Mol Biol.* **300**, 857-865.
- Merdan T, Kopecek J, and Kissel T (2002). Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* **54**, 715-758.
- Meyer O, Kirpotin D, Hong K, Sternberg B, Park JW, Woodle MC, and Papahadjopoulos D (1998). Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides. *J Biol Chem.* **273**, 15621-15627.
- Midoux P, Mendes C, Legrand A, Raimond J, Mayer R, Monsigny M, and Roche AC (1993). Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res.* **21**, 871-878.
- Mislick KA, and Baldeschwieler JD (1996). Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 12349-12354.
- Mislick KA, Baldeschwieler JD, Kayyem JF, and Meade TJ (1995). Transfection of folate-polylysine DNA complexes: evidence for lysosomal delivery. *Bioconjug Chem.* **6**, 512-515.
- Moffatt S, Wiehle S, and Cristiano RJ (2005). Tumor-specific gene delivery mediated by a novel peptide-polyethylenimine-DNA polyplex targeting aminopeptidase N/CD13. *Hum Gene Ther.* **16**, 57-67.
- Moghimi SM, and Gray T (1997). A single dose of intravenously injected poloxamine-coated long-circulating particles triggers macrophage clearance of subsequent doses in rats. *Clin Sci (Lond).* **93**, 371-379.
- Moghimi SM, and Hunter AC (2000). Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol.* **18**, 412-420.
- Monsigny M, Quétard C, Bourgerie S, Delay D, Pichon C, Midoux P, Mayer R, and Roche AC (1998). Glycotargeting: the preparation of glyco-amino acids and derivatives from unprotected reducing sugars. *Biochimie.* **80**, 99-108.
- Moradpour D, Schauer JI, Zurawski VR Jr, Wands JR, and Boutin RH (1996). Efficient gene transfer into mammalian cells with cholesteryl-spermidine. *Biochem Biophys Res Commun.* **221**, 82-88.
- Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, and Benoit JP (2008). Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials.* **29**, 3477-3496.
- Morimoto K, Nishikawa M, Kawakami S, Nakano T, Hattori Y, Fumoto S, Yamashita F, and Hashida M (2003). Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethylenimine on hepatoma cells and mouse liver. *Mol Ther.* **7**, 254-261.

- Neu M, Fischer D, and Kissel T (2005). Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med.* **7**, 992-1009.
- Nguyen HK, Lemieux P, Vinogradov SV, Gebhart CL, Guérin N, Paradis G, Bronich TK, Alakhov VY, and Kabanov AV (2000). Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents. *Gene Ther* **7**, 126-138.
- Niidome T, Urakawa M, Sato H, Takahara Y, Anai, T., Hatakayama T, Wada A, Hirayama T, and Aoyagi H (2000). Gene transfer into hepatoma cells mediated by galactose-modified alpha-helical peptides. *Biomaterials.* **21**, 1811-1819.
- Nimesh S, Goyal A, Pawar V, Jayaraman S, Kumar P, Chandra R, Singh Y, and Gupta KC (2006). Polyethylenimine nanoparticles as efficient transfecting agents for mammalian cells. *J Control Release.* **110**, 457-468.
- Nishikawa M (2005). Development of cell-specific targeting systems for drugs and genes. *Biol Pharm Bull.* **28**, 195-200.
- Nishikawa M, and Huang L (2001). Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther.* **12**, 861-870.
- Nishikawa M, Takemura S, Takakura Y, and Hashida M (1998). Targeted delivery of plasmid DNA to hepatocytes in vivo: optimization of the pharmacokinetics of plasmid DNA/galactosylated poly(L-lysine) complexes by controlling their physicochemical properties. *J Pharmacol Exp Ther.* **287**, 408-415.
- Ochietti B, Guérin N, Vinogradov SV, St-Pierre Y, Lemieux P, Kabanov AV, and Alakhov VY (2002). Altered organ accumulation of oligonucleotides using polyethyleneimine grafted with poly(ethylene oxide) or pluronic as carriers. *J Drug Target.* **10**, 113-121.
- Ogris M, Brunner S, Schüller S, Kircheis R, and Wagner E (1999). PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* **6**, 595-605.
- Ogris M, Steinlein P, Kursa M, Mechtler K, Kircheis R, and Wagner E (1998). The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther.* **5**, 1425-1433.
- Ogris M, Walker G, Blessing T, Kircheis R, Wolschek M, and Wagner E (2003). Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes. *J Control Release.* **91**, 173-181.
- Oudrhiri N, Vigneron JP, Peuchmaur M, Leclerc T, Lehn JM, and Lehn P (1997a). Gene transfer by guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 1651-1656.

- Oudrhiri N, Vigneron JP, Peuchmaur M, Leclerc T, Lehn JM, and Lehn P (1997b). Gene transfer by guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**, 1651-1656.
- Panetti TS, Wilcox SA, Horzempa C, and McKeown-Longo PJ (1995). Alpha v beta 5 integrin receptor-mediated endocytosis of vitronectin is protein kinase C-dependent. *J Biol Chem*. **270**, 18593-18597.
- Peeters L, Sanders NN, Jones A, Demeester J, and De Smedt SC (2007). Post-pegylated lipoplexes are promising vehicles for gene delivery in RPE cells. *J Control Release*. **121**, 208-217.
- Perricone MA, Morris JE, Pavelka K, *et al.* (2001). Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. II. Transfection efficiency in airway epithelium. *Hum Gene Ther*. **12**, 1383-1394.
- Petersen H, Fechner PM, Martin AL, Kunath K, Stolnik S, Roberts CJ, Fischer D, Davies MC, and Kissel T (2002). Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconj Chem*. **13**, 845-854.
- Philipp A, Meyer M, and Wagner E (2008). Extracellular targeting of synthetic therapeutic nucleic Acid formulations. *Curr Gene Ther*. **8**, 324-334.
- Pitard B, Aguerre O, Airiau M, Lachagès AM, Boukhnikachvili T, Byk G, Dubertret, C., Herviou C, Scherman D, Mayaux JF, and Crouzet J (1997). Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**, 14412-14417.
- Pitard B, Aguerre O, Airiau M, Lachagès AM, Boukhnikachvili T, Byk G, Dubertret, C., Herviou C, Scherman D, Mayaux JF, and J., C. (2002a). Supramolecular assemblies of DNA delivery systems. *Somat Cell Mol Genet*. **27**, 5-15.
- Pitard B, Bello-Roufaï M, Lambert O, Richard P, Desigaux L, Fernandes S, Lanctin C, Pollard H, Zeghal M, Rescan PY, and Escande D (2004). Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic Acids Res*. **32**, e159.
- Pitard B, Oudrhiri N, Lambert O, *et al.* (2001). Sterically stabilized BGTC-based lipoplexes: structural features and gene transfection into the mouse airways in vivo. *J Gene Med*. **3**, 478-487.
- Pitard B, Oudrhiri N, Vigneron JP, *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, *et al.* (2002b). A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles. *Hum Gene Ther*. **13**, 1767-1775.



- Pouton CW, Lucas P, Thomas BJ, Uduehi AN, Milroy DA, and Moss SH (1998). Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J Control Release*. **53**, 289-299.
- Pricer WE, and Ashwell G (1971). The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. *J Biol Chem*. **246**, 4825-4833.
- Rädler JO, Koltover I, Salditt T, and Safinya CR (1997). Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*. **275**, 810-814.
- Remy JS, Kichler A, Mordvinov V, Schuber F, and Behr JP (1995). Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**, 1744-1748.
- Rensen PC, Sliedregt LA, Ferns M, Kieviet E, van Rossenberg SM, van Leeuwen SH, van Berkel TJ, and Biessen EA (2001). Determination of the upper size limit for uptake and processing of ligands by the asialoglycoprotein receptor on hepatocytes in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. **276**, 37577-37584.
- Richard P, Bossard F, Desigaux L, Lanctin C, Bello-Roufai M, and Pitard B (2005a). Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles. *Hum Gene Ther*. **16**, 1318-1324.
- Richard P, Pollard H, Lanctin C, Bello-Roufaï M, Désigaux L, Escande D, and Pitard B (2005b). Inducible production of erythropoietin using intramuscular injection of block copolymer/DNA formulation. *J Gene Med*. **7**, 80-86.
- Richard-Fiardo P, Payen E, 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.
- Romøren K, Thu BJ, Smistad G, and Evensen Ø (2002). Immersion delivery of plasmid DNA. I. A study of the potentials of a liposomal delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *J Control Release*. **85**, 203-213.
- Roussel M, Moutard S, Perly B, Lefeuvre M, Benvegna T, and Plusquellec D (2003). Beta-anomeric selectivity in the glycosidation of D-mannofuranurono-6,3-lactone catalyzed by boron trifluoride diethyl etherate. *Carbohydr Res*. **338**, 375-378.
- Ruiz FE, Clancy JP, Perricone MA, *et al.* (2001). A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. *Hum Gene Ther*. **12**, 751-761.
- Rye CS, and Withers SG (2000). Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol*. **4**, 573-580.

- Sagara K, and Kim SW (2002). A new synthesis of galactose-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine for gene delivery to hepatocytes. *J Control Release*. **79**, 271-281.
- Sainlos M (2004). Transfert de genes à l'aide de substances bioactives. Thèse de doctorat de l'université de Paris 6.
- Sainlos M, Hauchecorne M, Oudrhiri N, Zertal-Zidani S, Aissaoui A, Vigneron JP, Lehn JM, and Lehn P (2005). Kanamycin A-derived cationic lipids as vectors for gene transfection. *ChemBiochem*. **6**, 1023-1033.
- Sakurai H, Kawabata K, Sakurai F, Nakagawa S, and Mizuguchi H (2008). Innate immune response induced by gene delivery vectors. *Int J Pharm*. **354**, 9-15.
- Schmutz M, Durand D, Debin A, Palvadeau Y, Etienne A, and Thierry AR (1999). DNA packing in stable lipid complexes designed for gene transfer imitates DNA compaction in bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 12293-12298.
- Schwartz AL (1984). The hepatic asialoglycoprotein receptor. *CRC Crit Rev Biochem*. **16**, 207-233.
- Schwartz AL, Fridovich SE, Knowles BB, and Lodish HF (1981). Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line. *J Biol Chem*. **256**, 8878-8881.
- Schwartz AL, Rup D, and Lodish HF (1980). Difficulties in the quantification of asialoglycoprotein receptors on the rat hepatocyte. *J Biol Chem*. **255**, 9033-9036.
- Shi F, Wasungu L, Nomden A, Stuart MC, Polushkin E, Engberts JB, and Hoekstra D (2002). Interference of poly(ethylene glycol)-lipid analogues with cationic-lipid-mediated delivery of oligonucleotides; role of lipid exchangeability and non-lamellar transitions. *Biochem J*. **366**, 333-341.
- Sliedregt LA, Rensen PC, Rump ET, van Santbrink PJ, Bijsterbosch MK, Valentijn AR, van der Marel GA, van Boom JH, van Berkel TJ, and Biessen EA (1999). Design and synthesis of novel amphiphilic dendritic galactosides for selective targeting of liposomes to the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J Med Chem*. **42**, 609-618.
- Smrekar B, Wightman L, Wolschek MF, Lichtenberger C, Ruzicka R, Ogris M, Rödl W, Kursá M, Wagner E, and Kircheis R (2003). Tissue-dependent factors affect gene delivery to tumors in vivo. *Gene Ther*. **10**, 1079-1088.
- Song LY, Ahkong QF, Rong Q, Wang Z, Ansell S, Hope MJ, and Mui B (2002). Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes. *Biochim Biophys Acta*. **1558**, 1-13.
- Spangenberg P, André C, Dion M, Rabiller C, and Mattes R (2000). Comparative study of new alpha-galactosidases in transglycosylation reactions. *Carbohydr Res*. **329**, 65-73.

- Spiess M (1990). The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry*. **29**, 10009-10018.
- Springer TA (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. **346**, 425-434.
- Sternberg B, Sorgi FL, 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.
- Szoka F, and Papahadjopoulos D (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **9**, 4194-4198.
- Tang MX, Li W, and Szoka FC Jr (2005). Toroid formation in charge neutralized flexible or semi-flexible biopolymers: potential pathway for assembly of DNA carriers. *J Gene Med*. **7**, 334-342.
- Tang MX, Redemann CT, and Szoka FC Jr (1996). In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug Chem*. **7**, 703-714.
- Tang MX, and Szoka FC (1997). The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther*. **4**, 823-832.
- Templeton NS (2002). Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo. *Biosci Rep*. **22**, 283-295.
- Templeton NS, Lasic DD, Frederik PM, Strey HH, Roberts DD, and Pavlakis GN (1997). Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat Biotechnol*. **15**, 647-652.
- 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.
- Verbaan FJ, Oussoren C, van Dam IM, Takakura Y, Hashida M, Crommelin DJ, Hennink WE, and Storm G (2001). The fate of poly(2-dimethyl amino ethyl)methacrylate-based polyplexes after intravenous administration. *Int J Pharm*. **214**, 99-101.
- Vigneron JP, Oudrhiri N, Fauquet M, Vergely L, Bradley JC, Basseville M, Lehn P, and Lehn JM (1996). Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**, 9682-9686.
- Vinogradov SV, Bronich TK, and Kabanov AV (1998). Self-assembly of polyamine-poly(ethylene glycol) copolymers with phosphorothioate oligonucleotides. *Bioconjug Chem*. **9**, 805-812.

- Wagner E, Cotten M, Foisner R, and Birnstiel ML (1991). Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 4255-4259.
- Wagner E, Culmsee C, and Boeckle S (2005). Targeting of polyplexes: toward synthetic virus vector systems. *Adv Genet.* **53**, 333-354.
- Wagner E, Ogris M, and Zauner W (1998). Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* **30**, 97-113.
- Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotten M, and Birnstiel ML (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.
- Walker GF, Fella C, Pelisek J, Fahrmeir J, Boeckle S, Ogris M, and Wagner E (2005). Toward synthetic viruses: endosomal pH-triggered deshielding of targeted polyplexes greatly enhances gene transfer in vitro and in vivo. *Mol Ther.* **11**, 418-425.
- Ward CM, Pechar M, Oupicky D, Ulbrich K, and Seymour LW (2002). Modification of pLL/DNA complexes with a multivalent hydrophilic polymer permits folate-mediated targeting in vitro and prolonged plasma circulation in vivo. *J Gene Med.* **4**, 536-547.
- Wheeler JJ, Palmer L, Ossanlou M, MacLachlan I, Graham RW, Zhang YP, Hope MJ, Scherrer P, and Cullis PR (1999). Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization. *Gene Ther.* **6**, 271-281.
- Wightman L, Kircheis R, Rössler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursa M, and Wagner E (2001). Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med.* **3**, 362-372.
- Wolfert MA, Dash PR, Nazarova O, Oupicky D, Seymour LW, Smart S, Strohaln J, and Ulbrich K (1999). Polyelectrolyte vectors for gene delivery: influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. *Bioconjug Chem.* **10**, 993-1004.
- Woodle MC, Scaria P, Ganesh S, Subramanian K, Titmas R, Cheng C, Y.J., Pan Y, Weng K, Gu C, and Torkelson S (2001). Sterically stabilized polyplex: ligand-mediated activity. *J Control Release.* **74**, 309-311.
- Wu GY, and Wu CH (1987). Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem.* **262**, 4429-4432.
- Wu J, Liu Q, and Lee RJ (2006). A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel. *Int J Pharm.* **316**, 148-153.
- Xu L, Huang CC, Huang W, Tang WH, Rait A, Yin YZ, Cruz I, Xiang LM, Pirollo KF, and Chang EH (2002). Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes. *Mol Cancer Ther.* **1**, 337-346.

Xu Y, and Szoka FC Jr (1996). Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*. **35**, 5616-5623.

Yew NS, Przybylska M, Ziegler RJ, Liu D, and Cheng SH (2001). High and sustained transgene expression in vivo from plasmid vectors containing a hybrid ubiquitin promoter. *Mol Ther*. **4**, 75-82.

Yin C, Ying L, Zhang PC, Zhuo RX, Kang ET, Leong KW, and Mao HQ (2003). High density of immobilized galactose ligand enhances hepatocyte attachment and function. *J Biomed Mater Res A*. **67**, 1093-1104.

Zabner J, Cheng SH, Meeker D, Launspach J, Balfour R, Perricone MA, Morris JE, Marshall J, Fasbender A, Smith AE, and Welsh MJ (1997). Comparison of DNA-lipid complexes and DNA alone for gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia in vivo. *J Clin Invest*. **100**, 1529-1537.

Zanta MA, Boussif O, Adib A, and Behr JP (1997). In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. *Bioconjug Chem*. **8**, 839-844.

Zhang S, Xu Y, Wang B, Qiao W, Liu D, and Li Z (2004). Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Control Release*. **100**, 165-180.

Zhao Y, Chany CJ 2nd, Sims PF, and Sinnott ML (1997). Definition of the substrate specificity of the 'sensing' xylanase of *Streptomyces cyaneus* using xylooligosaccharide and celooligosaccharide glycosides of 3,4-dinitrophenol. *J Biotechnol*. **57**, 181-190.

## **RESUME**

Le développement de nouveaux systèmes capables de transporter spécifiquement *in vitro* et *in vivo* des acides nucléiques dans des cellules cibles représente aujourd'hui un enjeu majeur pour le traitement de pathologies héréditaires ou acquises. Les vecteurs synthétiques cationiques utilisés jusqu'à présent s'avèrent très efficaces pour le transfert de gène *in vitro* mais la forte densité de charges positives présentes à la surface des complexes vecteurs/ADN conduit à une transfection non spécifique dans un type cellulaire donné. Ainsi un système alternatif a été développé pour s'affranchir des interactions non spécifiques avec les membranes cellulaires. Ce système correspond à un assemblage supramoléculaire proche de l'électroneutralité constitué d'un cœur d'ADN condensé et d'une couronne périphérique de stabilisateurs stériques ioniques ou non ioniques fonctionnalisés par des résidus galactose afin de cibler spécifiquement le récepteur aux asialoglycoprotéines présent à la surface des hépatocytes. La présence des résidus galactose permet à ce système d'exprimer spécifiquement un transgène dans les hépatocytes primaires alors que le système multimodulaire non galactosylé est incapable de transférer ces cellules. Dans une deuxième partie, une nouvelle génération de vecteurs synthétiques a été développée pour le transfert de gène dans le tissu pulmonaire ce qui constitue une alternative indispensable aux lipides cationiques couramment utilisés lors des essais cliniques qui induisent une forte toxicité se traduisant par une importante inflammation au niveau des voies aériennes. Ce nouveau système de vectorisation est constitué de copolymères à blocs amphiphiles fonctionnalisés par un ligand de type glycosidique qui permet d'améliorer l'efficacité de transfection des copolymères à blocs natifs en transfectant un plus grand nombre de cellules épithéliales pulmonaires.

*Mots-clés : transfert de gène non viral, récepteur aux asialoglycoprotéines, copolymères à blocs, endocytose, galactose, hépatocytes, poumons.*

## **ABSTRACT**

Targeted gene transfer is a promising approach to treat various acquired or hereditary diseases. Numerous synthetic cationic vectors have been synthesized and are successfully used for *in vitro* gene transfer but an excess of positive charges lead to cytotoxicity and does not enable specific transfection. Therefore, we decided to design alternative molecular gene delivery systems to target cellular internalization through the receptor-mediated endocytosis pathway instead of the regular non-specific electrostatic interactions with cell membranes. This alternative system corresponds to a new neutral supramolecular assembly of lipoplexes equipped with galactose residues to specific target asialoglycoprotein receptors located on hepatocytes. The presence of galactose residues on this alternative molecular system led to specific transfection of primary hepatocytes through a specific endocytosis whereas ungalactosylated multimodular system did not transfect at all. Then, a novel class of galactosylated amphiphilic block copolymers were developed for pulmonary gene transfer as an essential alternative to cationic lipids which lead to an important inflammation in the airways. The grafting of glycosyl residues onto the distal ends of block copolymers led to a significantly higher transfection efficiency in the lungs than unsubstituted block copolymers. Indeed, galactosylated block copolymers allows transgene expression in more epithelial pulmonary cells.

*Keywords : nonviral gene transfer, asialoglycoprotein receptor, block copolymers, endocytosis, galactose, hepatocytes, lungs.*

### **Emilie Letrou-Bonneval**

Institut du thorax, Inserm U915  
Faculté de Médecine  
1, rue Gaston Veil  
44035 Nantes Cedex 01