



HAL
open science

TRANSPORT TRANSENDOTHÉLIAL DE GÈNES : ÉTUDES DYNAMIQUES DU PASSAGE SÉLECTIF DE POLYPLEXES AU TRAVERS DE L'ENDOTHÉLIUM VASCULAIRE PULMONAIRE.

Eric Menneson

► **To cite this version:**

Eric Menneson. TRANSPORT TRANSENDOTHÉLIAL DE GÈNES : ÉTUDES DYNAMIQUES DU PASSAGE SÉLECTIF DE POLYPLEXES AU TRAVERS DE L'ENDOTHÉLIUM VASCULAIRE PULMONAIRE.. domain_other. Université d'Orléans, 2005. Français. NNT : . tel-00011964

HAL Id: tel-00011964

<https://theses.hal.science/tel-00011964>

Submitted on 16 Mar 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE D'ORLEANS

MEMOIRE DE THÈSE
présenté pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'ORLEANS

Discipline : biologie cellulaire et moléculaire

PAR

MENNESSON Eric

Transport transendothélial de gènes : études dynamiques du passage sélectif de polyplexes à travers l'endothélium vasculaire pulmonaire.

Directeur de thèse : Pr. Chantal PICHON
Soutenue le : 22 décembre 2005

MEMBRES DU JURY :

Pr. Francis DELMOTTE	Président, Pr, Université d'Orléans
Dr. Jean-Luc COLL	Rapporteur, CR-INSERM, La Tronche
Dr. Bruno PITARD	Rapporteur, CR-INSERM, Nantes
Pr. Pierre LEHN	Examineur, PU-PH, Université de Bretagne Occidentale, Brest
Pr. Chantal PICHON	Directeur de thèse, Pr, Université d'Orléans
Dr. Patrick MIDOUX	Co-directeur de thèse, DR-INSERM, Orléans

REMERCIEMENTS:

Ce travail a été effectué au Centre de Biophysique Moléculaire au C.N.R.S d'Orléans.

Je remercie le Pr. Chantal Pichon et le Dr. Patrick Midoux, qui a co-dirigé cette thèse, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe sur le projet Thérapie génique et vaccinologie.

Je remercie tous les membres des équipes du Dr. Claudine Kieda et du Dr. Véronique Piller qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je remercie enfin la Ligue contre le Cancer, Vaincre la mucoviscidose, l'AFM par qui j'ai obtenu un financement pour pouvoir réaliser cette thèse.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
TABLE DES MATIÈRES	2
ABRÉVIATIONS	6
INTRODUCTION	9
GÉNÉRALITÉS.	11
<u>II LA THÉRAPIE GÉNIQUE.</u>	11
<u>III LES VECTEURS POUR LA THÉRAPIE GÉNIQUE.</u>	19
<u>III L'ENDOTHELIUM PULMONAIRE.</u>	40
<u>IV LE FLUX SANGUIN.</u>	60
MATÉRIELS ET MÉTHODES	67
<u>II LES POLYMERES CATIONIQUES.</u>	67
<u>III LES PLASMIDES.</u>	67
<u>III CELLULES ET CULTURE CELLULAIRE.</u>	68
<u>IV LA FORMATION DES POLYPLEXES.</u>	69
<u>V CYTOMETRIE EN FLUX.</u>	69
<u>VII MICROSCOPIE CONFOCALE.</u>	69
<u>VII VIDEO-MICROSCOPIE EN CONDITION DE FLUX.</u>	70
<u>VIII ETUDE DU PASSAGE TRANSENDOTHELIAL DES POLYPLEXES.</u>	71
RÉSULTATS	72
<u>CHAPITRE I:</u>	72
INFLUENCE DE LA POLARISATION CELLULAIRE SUR L'INTERNALISATION ET L'EFFICACITE DE TRANSFECTION DES POLYPLEXES.	
<u>CHAPITRE II:</u>	84
PASSAGE TRANSENDOTHELIAL DES POLYPLEXES.	
<u>CHAPITRE III:</u>	95
ETUDES DE LA FIXATION DES POLYPLEXES SUR UNE MONOCOUCHE DE CELLULES HLMEC EN CONDITIONS DE FLUX.	
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	122
BIBLIOGRAPHIE	124

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	1
TABLE DES MATIÈRES	2
ABRÉVIATIONS	6
INTRODUCTION	9
GÉNÉRALITÉS.	11
<u>II LA THÉRAPIE GÉNIQUE.</u>	11
A] La thérapie génique.	11
B] Les maladies pulmonaires.	13
1) La mucoviscidose.	13
2) Le cancer du poumon.	14
C] Les essais cliniques autorisés.	16
<u>III LES VECTEURS POUR LA THÉRAPIE GÉNIQUE.</u>	19
A] Les vecteurs viraux.	19
B] Les vecteurs synthétiques.	19
1) Les lipides cationiques.	20
2) Les polymères et peptides cationiques.	23
2.1) La polylysine.	23
2.2) Le chitosane.	26
2.3) La polyéthylèneimine.	27
2.4) Les dendrimères.	30
2.5) Les polymères et peptides riches en histidines.	31
2.6) Les peptides cationiques.	34
2.7) Autres polymères.	37
2.8) Le transfert de gènes ciblé.	38
<u>III] L'ENDOTHELIUM PULMONAIRE.</u>	40
A] Biologie de l'endothélium pulmonaire.	40
1) Définition et structure de l'endothélium.	40
2) Fonctions de l'endothélium.	42
3) La perméabilité vasculaire.	43
4) Spécificité de l'endothélium pulmonaire.	45
B] Les différentes voies d'endocytose.	46

1) L'endocytose dépendante de la clathrine.	47
2) L'endocytose indépendante de la clathrine.	49
2.1) La pinocytose en phase liquide.	49
2.2) La potocytose et cavéoles.	49
2.3) La macropinocytose.	50
2.4) La phagocytose.	51
3) Les voies d'endocytose empruntées par les polyplexes à base de PEI ou de pLK.	51
C] Les différentes voies de passage transendothélial.	54
1) La voie intercellulaire ou paracellulaire.	54
2) Les voies intracellulaires.	57
2.1) Les fenestrae.	57
2.2) La transcytose.	58
<u>IV] LE FLUX SANGUIN.</u>	60
A] Les caractéristiques du flux sanguin.	60
B] Les effets du flux sanguin sur les cellules endothéliales.	61
1) Les effets des contraintes de cisaillement sur les cellules endothéliales.	61
2) Les mécano-senseurs des contraintes de cisaillement.	62
C] Ce que l'on sait sur le comportement des polyplexes PEI et pLK dans le flux sanguin.	65
MATÉRIELS ET MÉTHODES	67
<u>I] LES POLYMERES CATIONIQUES.</u>	67
<u>II] LES PLASMIDES.</u>	67
<u>III] CELLULES ET CULTURE CELLULAIRE.</u>	68
A] Lignées de cellules utilisées.	68
B] Culture des cellules polarisées.	68
<u>IV] LA FORMATION DES POLYPLEXES.</u>	69
<u>V] CYTOMETRIE EN FLUX.</u>	69
<u>VI] MICROSCOPIE CONFOCALE.</u>	69
<u>VII] VIDEO-MICROSCOPIE EN CONDITION DE FLUX.</u>	70
A] Culture des cellules HLMEC et mise en place du système de flux.	70
B] Acquisition et analyse des images.	70
<u>VIII] ETUDE DU PASSAGE TRANSENDOTHELIAL DES POLYPLEXES.</u>	71

RÉSULTATS	72
<u>CHAPITRE I:</u>	72
INFLUENCE DE LA POLARISATION CELLULAIRE SUR L'INTERNALISATION ET L'EFFICACITE DE TRANSFECTION DES POLYPLEXES.	
A) Introduction.	72
B) Publication: Mennesson <i>et al.</i>, 2005.	72
C) Conclusion.	83
<u>CHAPITRE II:</u>	84
PASSAGE TRANSENDOTHELIAL DES POLYPLEXES.	
A) Introduction.	84
B) Résultats.	84
1) Etude du passage transendothélial des polyplexes pLK-His et PEI.	84
1.1) Passage des polyplexes à travers le filtre.	84
1.2) Quantification du passage transendothélial.	87
2) Effet des cytokines sur le passage transendothélial des polyplexes.	89
C) Conclusion.	93
<u>CHAPITRE III:</u>	95
ETUDES DE LA FIXATION DES POLYPLEXES SUR UNE MONOCOUCHE DE CELLULES HLMEC EN CONDITIONS DE FLUX.	
A) Introduction.	95
B) Publication: Mennesson <i>et al.</i>, 2005.	97
C) Conclusion.	121
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	122
BIBLIOGRAPHIE	124

PUBLICATIONS:

Menesson E, Erbacher P, Piller V, Kieda C, Midoux P, Pichon C. (2005). Transfection efficiency and uptake process of polyplexes in human lung endothelial cells: a comparative study in non-polarized and polarized cells. *J Gene Med.*, 7, 729-738.

Goncalves C, Menesson E, Fuchs R, Gorvel JP, Midoux P, Pichon C. (2004). Macropinocytosis of polyplexes and recycling of plasmid via the clathrin-dependent pathway impair the transfection efficiency of human hepatocarcinoma. *Mol. Ther.*, 10, 373-385.

ABRÉVIATIONS

AAV : virus associé à l'adénovirus.
ADC : adénocarcinome.
ADN : acide désoxyribonucléique.
ADNp : acide désoxyribonucléique plasmidique.
ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine.
ACW : réseau d'actine corticale.
AMF : facteur autocrine de motilité.
AP : protéine adaptatrice.
ARN (m) : acide ribonucléique (messenger).
ATP : adénosine triphosphate.
Aux : auxiliaire de passage transmembranaire.
CCV : vésicule à clathrine (clathrin coated vesicle).
CFTR : régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose cystique.
Chlo : chloroquine.
CSD : domaine d'oligomérisation de la cavéoline.
CTS : signal de passage transmembranaire.
DAG : diacylglycérol.
DBS : signal de fixation de l'ADN (DNA binding signal).
DCs : cellules dendritiques.
DMSO : diméthylsulfoxyde.
dp : degré de polymérisation.
DPAB : bandes périphériques denses d'actine (dense peripheral actin band).
EBM-2 : milieu basal pour cellule endothéliale.
EBV : virus d'*Epstein Barr*.
ECs : cellules endothéliales.
ECV : vésicule de transport.
ECV/MVBs : vésicules de transport et corps multivésiculaires.
EDTA : éthylène diamine tétraacétate de sodium.
EGF : facteur de croissance épidermique.
EGFR : récepteur de l'EGF.
eNOS : NO synthase endothéliale.
ERK: kinases régulées par un signal extracellulaire (extracellular signal-regulated kinases).
FAK: kinase d'adhésion focale (focal adhesion kinase).
FBS : sérum de veau foetal.
FITC : isothiocyanate de fluorescéine.
Flk-1 : récepteur du VEGF.
GA-1000 : gentamicine sulfate.
GPCR : récepteurs couplés aux protéines G.
GPI : glycoposphatidylinositol.
GTP: guanosine triphosphate.
hEGF : facteur de croissance épidermique humain.
hFGF-B : facteur de croissance fibroblastique humain.
His : histidine.
HLMEC : cellules endothéliales humaines des microvaisseaux du poumon.
HoK : oligolysine histidylée.
HPR : horseradish peroxidase.
ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire 1.

IFN- γ : interféron γ .
IKK : kinases spécifiques de la protéine I κ B.
IL : interleukine.
IP3 : inositol 1,4,5 triphosphate.
JAM : molécule d'adhésion jonctionnelle.
Kpb : kilo paires de bases.
LDL : lipoprotéine de faible densité.
Lipo : lipides cationiques.
LSS : contraintes de cisaillement laminaire (laminar shear stress)
MAPK : MAP kinase.
MEM : milieu minimum essentiel d'Eagle.
MLCK : kinase des chaînes légères de myosine.
NLS : signal de localisation nucléaire.
NO : monoxyde d'azote.
NSC : canaux cationiques non sélectifs.
NSCLC : cancer non à petites cellules.
ODN : oligodesoxynucléotides.
OptiMEM : milieu optimisé pour les transfections.
PAI-1 : inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène.
PAMAM : polyamidoamine.
PBS : tampon phosphate salin pH = 7,4.
PDEII : phosphodiesterase II.
pDMAEMA : poly(2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate).
PECAM-1 : molécule d'adhésion cellules endothéliales-plaquettes.
PEG : polyéthylène glycol.
PEI : polyéthylèneimine.
PET : PBS avec 0,02% d'EDTA et 2,5 μ g/ml de trypsine.
PFA : paraformaldéhyde.
PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase.
PIP2 : phosphatidyl inositol 2 phosphate.
PKA : protéine kinase A.
PKC : protéine kinase C.
PLC : phospholipase C.
pLK : poly-L-lysine.
pLK-His : poly-L-lysine histidylée.
PMA : Phorbol Myristate Acétate.
R³-IGF-1 : forme recombinante du facteur de croissance analogue à l'insuline.
RE : réticulum endoplasmique.
RLU : unité de lumière relative.
ROS : espèces réactives de l'oxygène.
RTK : récepteurs à activité tyrosine kinase.
SAB : sérum albumine bovine.
SCLC : cancer à petites cellules.
SHP-2 : tyrosine phosphatase.
SNAP : Soluble NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor) Attachment Protein.
SNARE : récepteur SNAP.
SOC : canal calcique capacitif.
SV40 : virus *simien 40*.
SVF : sérum de veau fœtal.
TEER : résistance transendothéliale.
TGF- β : facteur de croissance transformant β .

TNF- α : facteur de nécrose des tumeurs.
t-PA : activateur tissulaire du plasminogène.
TRPC : canaux calciques non sélectifs.
TSS : contraintes de cisaillement turbulentes (turbulent shear stress).
VAMP : protéine en position transmembranaire vésiculaire.
VASP : vasodilator-stimulated phosphoprotein.
VEGF : facteur de croissance endothélial vasculaire.
vWF : facteur de von Willebrand.
ZO-1 : protéine Zonula Occludens 1.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La thérapie génique est une nouvelle approche de traitement ou de prévention des maladies qui utilise des acides nucléiques comme médicaments. Elle consiste, en particulier, à transférer des gènes dans les cellules des patients afin de corriger un gène endogène déficient comme dans le cas de maladies héréditaires (la mucoviscidose, la myopathie etc...), de moduler l'expression de gènes endogènes connus ou de tuer des cellules cancéreuses.

La recherche génomique a permis des progrès considérables dans le décriptage de la carte du génome humain. L'un de ses principaux objectifs est la découverte et l'identification d'un grand nombre de gènes impliqués dans des maladies diverses, ainsi que la découverte et l'analyse de la fonction de ces gènes. Le potentiel représenté par cette accumulation de données pour la thérapie génique est cependant limité par la nécessité de transformer ces gènes en médicaments pour les transférer efficacement dans les cellules. L'une des transformations majeures est leur association avec un système de transfert (ou vecteur). Jusqu'à présent, peu de solutions existent pour transférer des gènes avec succès et en toute sécurité dans les cellules du patient. En conséquence, le développement de tels vecteurs occupe une position centrale dans la mise en œuvre de la thérapie génique en vue d'exploiter ainsi les avancées de la recherche génomique.

Les vecteurs peuvent être d'origine virale ou synthétique. Les plus utilisés sont des vecteurs viraux de différentes natures, qui ont été modifiés pour introduire un transgène dans leur génôme et atténués afin de transférer avec le plus de sécurité possible le matériel génétique souhaité dans les cellules du patient. Des vecteurs non viraux, tels que des polymères cationiques ou des lipides cationiques, sont parallèlement activement développés pour transférer des gènes dans les cellules avec une meilleure sécurité que les vecteurs viraux.

Au laboratoire, ont été développés des polymères et des lipides cationiques. Les polymères cationiques sont à base de polylysine et peuvent former des complexes électrostatiques avec un ADN plasmidique afin de permettre la compaction et faciliter la pénétration de celui-ci dans les cellules. Ces complexes ADN/polymère cationique sont appelés polyplexes. La mise au point de la polylysine histidylée qui possède des propriétés fusio-gènes en milieu acide, constitue une amélioration par rapport à la polylysine car elle permet en plus de favoriser le passage de l'ADN dans le cytosol des cellules.

L'efficacité de la transfection dépend, en effet, de la réalisation de plusieurs étapes successives par les polyplexes et/ou l'ADN, qui doivent entre autre traverser plusieurs barrières intra et extracellulaires.

Les étapes intracellulaires sont notamment l'internalisation de l'ADN dans la cellule, le passage dans le cytosol, la diffusion dans le cytosol, l'importation dans le noyau cellulaire ainsi que l'accessibilité de l'ADN à la machinerie nucléaire pour l'expression du gène. Ainsi, si l'on veut développer des vecteurs qui assurent ces différentes étapes, il faut s'assurer du trafic et du devenir intracellulaire des polyplexes et de l'ADN. Par exemple, pour pénétrer dans le noyau, la disponibilité du plasmide dans le cytosol repose sur l'efficacité des polyplexes à déstabiliser les vésicules d'endocytose. La connaissance du pH des vésicules dans lesquelles transitent les polyplexes permettra de concevoir des molécules adaptées pour déstabiliser ces vésicules. Il est tout aussi important d'avoir une idée sur le devenir intracellulaire des polyplexes et du plasmide en particulier quelle est leur stabilité, la nature des compartiments où ils s'accumulent et de savoir s'ils sont dégradés. La première étape que les polyplexes doivent réaliser est leur internalisation dans les cellules. Ces mécanismes (endocytose, phagocytose...) comme nous le verrons sont multiples, complexes et interconnectés. De plus, peu d'études approfondies sur l'internalisation des polyplexes ont été réalisées et un certain nombre de résultats montre une absence de relation entre la quantité de polyplexes internalisés et l'efficacité de transfection.

Lors d'une administration systémique (en Intra Veineuse), les polyplexes ont à faire face à des barrières extracellulaires comme les composants du sang, la paroi des vaisseaux et microvaisseaux et l'entrée dans les organes avant d'atteindre les cellules cibles. Dans le cas d'une injection intratumorale de l'ADN thérapeutique, le nombre de ces barrières est limité. L'injection systémique représente donc une voie plus adaptée pour une action sur des tumeurs difficiles d'accès ou des métastases disséminées mais également pour une action antiangiogénique sur les cellules endothéliales elles-même. Dans les traitements de la mucoviscidose, maladie génétique affectant principalement les cellules épithéliales des voies aériennes, l'administration des polyplexes par les voies aériennes présente certains inconvénients tels que le passage d'un épais mucus et la stabilité des polyplexes dans les systèmes d'injection (aérosol, nébulisateur...). L'administration systémique représente pour le traitement de cette pathologie une voie alternative intéressante si l'on dispose de vecteurs capables de former des polyplexes stables dans le sang, de cibler l'endothélium pulmonaire, de le traverser et d'atteindre les cellules malades. C'est dans ce domaine que se situent les travaux que j'ai entrepris.

En particulier, j'ai réalisé une étude de l'internalisation et du passage transendothélial des polyplexes dans un modèle d'endothélium pulmonaire humain. J'ai ensuite étudié la fixation de ces polyplexes sur l'endothélium pulmonaire en conditions de flux. Cette étude a été menée avec des polyplexes formés avec de la polylysine histidylée et de la polyéthylèneimine.

Après avoir exposé les généralités sur la thérapie génique, les vecteurs, les différentes voies d'endocytose et l'endothélium pulmonaire, je présenterai mes travaux concernant l'endocytose des polyplexes dans notre modèle d'endothélium pulmonaire *in vitro*. Puis j'aborderai la capacité de ces polyplexes à traverser l'endothélium. Enfin je terminerai sur une étude de la fixation des polyplexes en conditions de flux.

GÉNÉRALITÉS

GÉNÉRALITÉS.

I] LA THÉRAPIE GÉNIQUE.

A] La thérapie génique.

La thérapie génique est une approche thérapeutique basée sur l'utilisation d'acides nucléiques (ADN, ARN, ODN) exogènes pour modifier l'expression de certains gènes d'une cellule dans le but de prévenir ou de traiter certaines pathologies. La mise en place de thérapies géniques nécessite de comprendre les bases génétiques liées aux maladies humaines.

L'homme possède un patrimoine génétique d'environ 20-25 000 gènes. En 1990, un effort international a été entrepris avec l'émergence du "Human Genome Project" pris en main par le *U.S. Department of Energy and the National Institutes of Health*. Le chromosome 22 a été le premier entièrement séquencé en 1999 et en 2004 l'ensemble du génôme humain. Le but de ce projet était de séquencer totalement le génome humain et à partir de là, posséder une parfaite connaissance des différents gènes humains. Ce défi relevé a une portée considérable quant aux applications pour la thérapie génique. En effet, le principe de la thérapie génique est basé sur la correction d'une maladie génétique. Compte tenu de ces avancées, de nombreux problèmes d'éthique ont été soulevés et ont contribué à différencier clairement les deux formes de thérapie génique qui se distinguent selon la nature des cellules à modifier génétiquement.

La thérapie génique germinale a pour objectif de modifier l'expression d'un gène au sein des cellules germinales permettant la transmission d'un nouveau caractère génétique à la descendance. L'introduction d'un nouveau gène au niveau des cellules germinales est déjà couramment pratiquée pour l'obtention d'animaux ou de végétaux transgéniques (Gordon *et al.*, 1980; Costantini et Lacy, 1981), dans le cadre de l'amélioration des races, dans le développement de modèles expérimentaux de maladies génétiques chez l'animal ou encore dans les études de contrôle et de régulation de l'expression des gènes. Chez l'homme, cette forme de manipulation est interdite par divers comités d'éthique internationaux. Compte tenu de l'impact éthique d'une telle manipulation, la thérapie germinale a peu d'avenir pour une application thérapeutique humaine.

A l'opposé, la thérapie génique somatique est source d'espoir pour le traitement de nombreuses maladies génétiques, acquises et infectieuses. Il s'agit ici de manipuler l'expression des gènes dans les cellules non germinales (somatiques) afin de corriger une anomalie dont la correction ne sera pas transmise à la descendance. Cette dernière approche fait l'objet de très nombreux travaux de recherche dans le monde. Un des grands paris consiste à élaborer des vecteurs spécifiques, efficaces et sécurisants afin de faire pénétrer un "gène médicament" dans les cellules. Compte tenu de la capacité à infecter les cellules par introduction de leur matériel génétique, les virus sont à la base des vecteurs pour la thérapie génique. En effet, pendant des milliers d'années d'évolution, les virus ont développé un extraordinaire potentiel d'acheminement et de ciblage de leur génome dans les cellules hôtes.

Les principaux travaux menés sur ces vecteurs ont consisté à supprimer les composantes virales responsables des maladies qu'elles induisaient. Il s'agit de fabriquer des virus atténués et modifiés génétiquement ayant gardé leur capacité à délivrer du matériel génétique et perdu leur pouvoir de réplication. Historiquement, ce sont les vecteurs rétroviraux ou virus oncogènes qui ont ouvert la voie à la transgénèse somatique chez l'homme.

La thérapie génique a ouvert de nouveaux espoirs notamment pour mieux lutter contre le cancer, la mucoviscidose ou la myopathie. Néanmoins, l'utilisation clinique de ces vecteurs

soulève encore de nombreux problèmes, ce qui a conduit les chercheurs à se lancer dans la mise au point de vecteurs synthétiques.

Les thérapies géniques peuvent s'opérer à deux niveaux:

in vivo en modifiant directement des cellules présentant des anomalies de certains gènes ou en modifiant des cellules normales pour produire *in vivo* un agent capable de palier à ces anomalies. Le transfert d'un ADN plasmidique permet d'apporter un gène médicament pour corriger une fonction déficiente d'un gène muté. Une autre approche consiste à éteindre l'expression d'un gène en introduisant dans la cellule des oligodésoxynucléotides antisens (ODN). Ces fragments d'ADN simple-brin, synthétisés en laboratoire, longs de 12 à 25 nucléotides, sont capables de reconnaître spécifiquement un ARN messenger naturel par appariement des bases complémentaires et d'empêcher ainsi sa traduction en protéine, après destruction des hybrides ADN-ARN par des enzymes spécifiques (Garcia-Chaumont *et al.*, 2000). Des oligonucléotides ADN particuliers peuvent également cibler un gène. Ils forment alors une triple-hélice locale inhibant la transcription (Bielinska *et al.*, 1996). De même, la technologie des ARN interférences est basée sur l'inactivation spécifique d'un ARNm par l'utilisation d'un petit ARN double brin (siARN) pouvant s'apparier avec un ARNm provoquant sa dégradation (Gilmore *et al.*, 2004). L'introduction dans une cellule, des ODN antisens ou triple hélice ainsi que des siRNA peut se faire par l'intermédiaire d'un plasmide codant ces différents acides nucléiques courts.

ex vivo par transfert de gènes dans des cellules isolées du patient qui sont ensuite réintroduites chez le patient. Il s'agit alors d'une autogreffe de cellules génétiquement modifiées. Cette stratégie est particulièrement adaptée au transfert de gènes dans les cellules présentatrices d'antigènes pour stimuler une réponse immune spécifique. En effet, il est maintenant possible d'obtenir des cellules dendritiques (DCs) en grande quantité à partir de précurseurs (monocytes ou cellules souches hématopoïétiques CD34⁺) présents dans le sang périphérique et de les maturer en présence de chimiokines et de facteurs de croissance. Ceci permet, par exemple, leur manipulation *ex vivo* suivie d'une réinjection chez l'homme dans le cadre d'une immunothérapie cellulaire anticancéreuse ou antivirale (voir la revue de Ribas *et al.*, 2002). La transfection des DCs avec des gènes codant des antigènes viraux ou tumoraux pour produire *in situ* une molécule d'intérêt vaccinal et présenter les peptides antigéniques favorise une réponse T cytotoxique spécifiquement dirigée contre l'ensemble des épitopes de cette molécule, notamment lorsque les épitopes ne sont pas connus ou mal présentés dans leur conformation naturelle. Par rapport au transfert d'ADN, le transfert d'ARNm qui permet de produire *in situ* un antigène capable d'être bien présenté par les DCs et d'induire une réponse immune est utilisé avantageusement (Gilboa et Vieweg, 2004). En effet, la traduction de l'ARNm s'effectue dans le compartiment cytosolique sans intervention de la machinerie nucléaire, alors que l'expression du gène nécessite son incorporation dans le noyau après transfection d'un ADN plasmidique. Cette étape est encore loin d'être réalisable dans le cas des cellules quiescentes avec des vecteurs non viraux.

Dans les deux approches (*in vivo* et *ex vivo*), plusieurs facteurs sont importants pour arriver à un effet thérapeutique du gène délivré comme l'efficacité du transfert de gènes (nombre de cellules modifiées génétiquement et amplitude de l'expression du transgène), la durée de l'expression transgénique, l'obtention d'une protéine fonctionnelle, le ciblage cellulaire, la régulation tissu-spécifique du transgène et l'innocuité de la méthode de transfert de gènes pour l'individu et son environnement.

Dans le traitement de maladies pulmonaires comme le cancer ou la mucoviscidose, la thérapie génique représente un grand espoir. Pour le transfert de gènes, le poumon a le grand avantage d'être accessible par les voies aériennes et par la circulation sanguine. L'administration par les voies aériennes permet un accès direct aux cellules épithéliales mais nécessite le passage à travers le mucus qui est épais chez les patients atteints de la mucoviscidose. De plus, les systèmes d'instillation et d'aérosolisation doivent garantir la

stabilité du gène. Autre inconvénient, la majorité des récepteurs des virus ainsi que d'autres susceptibles d'être utilisés pour cibler des polyplexes se trouvent du côté basolatéral des cellules épithéliales et sont donc très peu accessibles par la voie aérienne. Nous avons choisi de nous intéresser à la délivrance de gènes par une administration systémique et de traiter quelques difficultés inhérentes à ce type d'administration comme la stabilité et le comportement des particules dans le sang, le ciblage du poumon et le passage transendothélial pour atteindre les cellules épithéliales.

Bl Les maladies pulmonaires.

1) La mucoviscidose.

La mucoviscidose (cystic fibrosis en anglais) est la maladie génétique autosomique récessive la plus fréquente en occident (1/2500 naissances) (voir la revue de Boucher, 2002). Cette maladie se caractérise par un transport anormal de sel et d'eau au niveau des cellules épithéliales pancréatiques, gastrointestinales et des voies respiratoires. Le poumon est l'organe le plus atteint avec des sécrétions anormales, un nettoyage mucociliaire réduit et des infections bactériennes chroniques. La morbidité est principalement due à une dégradation progressive de la fonction respiratoire. Les atteintes digestives se manifestent par une insuffisance pancréatique. L'amélioration du traitement des patients a permis d'augmenter leur durée de vie, notamment grâce au développement de la kinésithérapie respiratoire et l'antibiothérapie. Cependant, ces traitements sont symptomatiques et la transplantation pulmonaire reste l'ultime recours. La thérapie génique représente un grand espoir pour le traitement de cette maladie. En effet, le gène muté est le gène CF situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31). Il a été découvert et cloné en 1989 (Riordan *et al.*, 1989). Ce gène code pour une protéine régulatrice de la conductance transmembranaire, la protéine CFTR. Plus de 1000 mutations ont été recensées mais la mutation $\Delta F508$ est la plus fréquente (70%). Cette mutation est une délétion de trois paires de bases spécifiant la phénylalanine en position 508 de la séquence protéique. La protéine CFTR est présente au niveau de l'épithélium respiratoire majoritairement dans les cellules glandulaires séreuses mais aussi dans les cellules ciliées, les cellules bronchiolaires et alvéolaires. La mutation $\Delta F508$ conduit à un mauvais repliement et à un trafic intracellulaire de la protéine mutante perturbé (Cheng *et al.*, 1990). En effet, celle-ci n'est pas exportée vers la membrane apicale des cellules épithéliales.

Dans les conditions normales, l'épithélium des voies aériennes a la capacité d'absorber ou de sécréter du liquide pour réguler le volume de la couche de liquide périciliaire. Dans ces conditions, le canal CFTR permet la sortie des ions Cl^- des cellules épithéliales. Ce canal régule négativement l'absorption d'ions Na^+ en agissant sur le canal Na^+ . Ce transport s'accompagne d'une sortie passive d'eau via un canal type aquaporine. Ce transport actif transépithélial d'ions permet ainsi de contrôler la couche de liquide périciliaire qui régule par un mécanisme passif, le volume de la couche de mucus. Ce contrôle des volumes de la couche de liquide périciliaire et de la couche de mucus permet une évacuation des particules qui se trouvent dans les voies aériennes dans les 6 heures. Lorsque le gène CF est muté et que la protéine CFTR n'est pas présente à la membrane apicale de la cellule, il y a une absorption excessive de Na^+ et une rétention de Cl^- dans la cellule empêchant la sortie passive de l'eau. Cela entraîne une déshydratation de la couche de liquide périciliaire et ralentit le renouvellement de la couche de mucus. Les cellules caliciformes sécrètent de la mucine qui génère des plaques et bouche les voies aériennes. Ce mucus non renouvelé est favorable aux infections bactériennes.

Il a été montré qu'un apport du gène normal dans un nombre de cellules épithéliales pulmonaires compris entre 6 et 10% restore la fonction normale de transport de Cl^- par le

canal CFTR (Johnson *et al.*, 1992). De plus, un niveau d'expression du gène *cftr* de seulement 5 % par rapport à la normale permet une correction de 50 % de la fonction de transport ionique (Dorin *et al.*, 1996).

2) Le cancer du poumon.

Le cancer du poumon est l'un des cancers les plus répandus (le premier chez l'homme et le deuxième chez la femme). Plus de 1,2 millions de nouveaux cas sont diagnostiqués par an dans le monde. Il représente 12,8% des cancers et 17,8% de la mortalité dûe aux cancers (Imyanitov *et al.*, 2005).

Il existe différents types de cancer du poumon : les cancers primitifs dont le foyer primaire apparaît en premier dans les poumons et les cancers secondaires (métastases) qui ont gagné les poumons après leur évolution dans d'autres organes. Les cancers primitifs peuvent se différencier par un examen anatomopathologique en fonction de la taille des cellules tumorales (Hoffman *et al.*, 2000). Les cancers non à petites cellules (NSCLCs) regroupent les cancers épidermoïdes (35-40%), les adénocarcinomes (25-35%), les carcinomes à grandes cellules (10-15%). Les carcinomes à petites cellules (SCLCs) représentent entre 20 et 25% des cancers primitifs. Ces quatre catégories comptabilisent environ 95% des cancers du poumon. Il existe également des tumeurs carcinoïdes et des tumeurs muco-épidermoïdes plus rares représentant les 1 à 2% restants.

Les NSCLCs ont tendance à se déclarer dans la partie médiane du poumon, au point d'entrée des bronches et des principaux nerfs et vaisseaux sanguins. L'évolution de ces cancers peut être divisée en quatre étapes. Le premier stade est un cancer très localisé, qui n'a pas envahi les ganglions lymphatiques. Au second stade, le cancer s'est étendu aux ganglions lymphatiques voisins. Pour le troisième stade, le cancer s'est étendu à des organes voisins de sa localisation initiale (paroi thoracique, etc.). Le quatrième stade représente une extension du cancer à un organe de localisation éloignée (métastase).

Les SCLCs prennent habituellement naissance dans les cellules des bronches, des bronchioles, des alvéoles ou des tissus qui soutiennent le poumon. Ces cancers à petites cellules sont à un stade limité quand le cancer reste dans le thorax puis passent à des pathologies disséminées lorsque des métastases ont atteint d'autres organes.

Le développement des cancers du poumons est favorisé par des causes environnementales, notamment le tabagisme. La fumée de tabac ne contient pas moins de 40 à 60 carcinogènes qui induisent des dommages sur l'ADN ou des mutations dans des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Les prédispositions génétiques jouent également un rôle important.

La plupart des cancers du poumon sont stimulés de façon autocrine et paracrine. En effet, les cellules cancéreuses reçoivent de mauvais signaux de croissance. Ceci va être amplifié par des mutations sur les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Le tableau 1 présente la fréquence des mutations sur ces gènes dans les cancers du poumon.

Tableau 1: Principales mutations dans les cancers du poumon.

Gènes	Caractéristiques	Références
Mutations activatrices (oncogènes)		
EGFR/HER1/ ERBB1	Dans environ 30% des tumeurs des patients d'Asie du Sud Est et dans moins de 10% des tumeurs des autres ethnies. Souvent associé à l'histologie de l'ADC	Shigematsu <i>et al.</i> , 2005
HER2/ERBB2	Dans 10% des ADCs mais pas dans les autres NSCLCs	Stephens <i>et al.</i> , 2004
K-ras	Dans 15-20% des NSCLCs (principalement les ADCs) mais pas dans les SCLCs	Forgacs <i>et al.</i> , 2001
MET	Dans les NSCLCs et les SCLCs	Ma <i>et al.</i> , 2005
Mutations inactivatrices (gènes suppresseurs de tumeurs)		
p53	Dans environ 90% des SCLCs et 50% des NSCLCs	Fischer et Lahm, 2004
RB1	Très fréquent dans les SCLCs mais pas dans les NSCLCs	Kaye, 2001
p16^{INK4a}	Fréquent dans les NSCLCs mais pas dans les SCLCs	Kaye, 2001
LKB1/STK11	Fréquence notable dans les ADCs	Fernandez <i>et al.</i> , 2004
MYO18B	Fréquence moyenne dans les NSCLCs et les SCLCs	Nishioka <i>et al.</i> , 2002
M6P/IGF2R	Fréquent dans les SCCs	Kong <i>et al.</i> , 2000

D'après Imyanitov, 2005. Les abréviations correspondent respectivement à ADC : adénocarcinome, NSCLCs : cancers non à petites cellules (non small cell lung cancer), SCLCs : cancers à petites cellules (small cell lung cancer).

Parmi les oncogènes, on peut citer ceux codant pour les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGF), EGFR et erb-B2. Plus généralement, les NSCLCs surexpriment presque toujours les récepteurs à tyrosine kinase (RTK). Les mutations de MET, récepteur du facteur de croissance hépatocytaire (HGF), sont également très présentes dans les cancers du poumon. L'activation de ces récepteurs déclenche des voies de signalisation régulant le cycle cellulaire. Cette activation pathologique est souvent attribuée à des mutations sur les gènes codant pour les protéines impliquées dans ces voies. La protéine K-ras mutée, par exemple, reste dans une configuration activée ce qui l'empêche de réguler la voie de signalisation dont elle dépend.

La voie RB, qui contrôle négativement l'entrée dans le cycle cellulaire, est souvent inactivée. La protéine RB1 (RétinoBlastome 1) mutée, initie l'expression de gènes spécifiques de la phase S. D'autres protéines comme P16^{INK4A} qui interviennent dans la régulation de cette voie sont également mutées. Le gène p53 est très fréquemment muté dans les cancers du poumon. Ces mutations contribuent à la dérégulation du cycle cellulaire et au blocage de l'entrée en apoptose.

D'autres gènes ont des mutations inactivatrices comme *myo18b* qui codent pour une chaîne lourde de la myosine, LKB1 qui participe à l'inhibition de la croissance cellulaire et à l'arrêt du cycle en G1 ou encore le gène codant pour le récepteur M6P/IGF2R (mannose 6-

phosphate/insulin-like growth factor II receptor) qui joue un rôle dans la suppression de la croissance tumorale.

De nombreuses stratégies de thérapie génique sont envisagées dans le traitement des cancers pulmonaires avec une approche immunologique ou moléculaire (El-Aneed, 2004).

L'immunothérapie génique consiste à élaborer des vaccins soit en manipulant *ex vivo* les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques avec des gènes codant des antigènes tumoraux soit en injectant directement des gènes vectorisés. Bien que les cellules cancéreuses soient naturellement immunogènes, la réponse immunitaire induite n'est pas assez importante pour éradiquer les tumeurs. Il est aussi possible de transférer dans les cellules tumorales des gènes codant pour des cytokines stimulant la réponse immunitaire.

L'approche moléculaire consiste à agir sur la croissance tumorale en inactivant les oncogènes ou en apportant les gènes exogènes pour remplacer les gènes suppresseurs de tumeurs mutés. En tant qu'anti-oncogènes, des ADN antisens qui vont se fixer sur l'oncogène ou sur son ARNm pour bloquer l'expression de la protéine ont été exploités. La thérapie anti-angiogénique consiste à inhiber les inducteurs de l'angiogénèse (VEGF) ou introduire des inhibiteurs comme l'angiostatine, l'endostatine, IL-12 et p53 (Chen *et al.*, 2001). Cette stratégie a pour but d'inhiber la formation des vaisseaux qui vont irriguer les tumeurs. Une autre stratégie est l'utilisation de gènes suicides. Il s'agit de transférer les cellules tumorales avec un gène codant pour une enzyme capable de convertir des substances non toxiques administrées *a posteriori* en agents physiologiquement actifs (Qiao *et al.*, 2002).

C| Les essais cliniques autorisés.

Compte tenu des nombreux problèmes d'éthique que soulève la thérapie génique germinale, seule la thérapie génique somatique est autorisée chez l'homme. Les essais cliniques de thérapie génique réalisés à ce jour dans le monde pour diverses maladies peuvent être consultés sur le site web à www.wiley.co.uk/genmed (*Journal of Gene Medicine*, John Wiley et Sons, 2001) dont le Tableau 2 ci-dessous est tiré.

Tableau 2: Essais cliniques des maladies traitées par thérapie génique.

Maladies		Protocoles	
		Nombre	%
Cancers	♦ Carcinomes pulmonaires	715	66
	♦ Cancer de l'ovaire		
	♦ Carcinomes hépatiques		
	♦ Glioblastomes		
	♦ Mélanomes		
Maladies Monogéniques	♦ Mucoviscidose	95	8,8
	♦ Hémophilie B		
	♦ Hypercholestérolémie familiale		
	♦ Déficience en adénosine désaminase (ADA)		
	♦ Immunodéficience sévère liée au chromosome X		
Maladies Infectieuses	♦ Syndrome d'immuno-déficience acquise (SIDA)	72	6,7
Maladies Vasculaires		92	8,6
Autres Maladies	♦ Arthrites rhumatoïdes	33	3,1
	♦ Sclérose latérale amyotrophique		
	♦ Maladies artérielles coronariennes		
Gènes Rapporteurs		52	4,8
Volontaires sains		17	1,6
Total		1076	

Le premier essai clinique mené par l'équipe de Rosenberg en 1989 (Rosenberg *et al.*, 1990) a montré la potentialité des vecteurs viraux et la faisabilité de la thérapie génique. Les essais cliniques ont consisté dans un premier temps à corriger des maladies engendrées par une anomalie portée par un seul gène : le premier essai a eu lieu en 1990 pour corriger une immunodéficience héréditaire liée à une déficience du gène *ADA* (*Adénosine désaminase*) et des problèmes d'hypercholestérolémie dans le sérum (Kohn *et al.*, 1998).

Le premier succès mondial d'une thérapie génique chez l'homme a été obtenu en 2000 par l'équipe du professeur Alain Fischer de l'hôpital Necker à Paris. Cette équipe a réussi à traiter des "enfants bulle" en corrigeant leur immunodéficience sévère liée au chromosome X (SCID-X1) caractérisée par un blocage de la différenciation des lymphocytes T et Natural Killer, améliorant ainsi leurs graves déficiences immunitaires (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000). Cependant, deux enfants ont montré une prolifération de leurs clones T à cause d'une intégration du vecteur rétrovirus à proximité du proto-oncogène LMO2 (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003).

La plupart (63%) des essais cliniques chez l'homme sont en phase I, c'est à dire que l'on évalue uniquement la tolérance du traitement. Seulement environ 1,9 % des essais cliniques concerne la phase III, c'est à dire un traitement effectif d'une maladie par thérapie génique.

Les essais thérapeutiques chez des patients atteints de mucoviscidose ont débuté en 1993. Aujourd'hui, 33 essais cliniques ont été réalisés ou sont en cours dont 3 en phase II. 21 essais concernent des vecteurs viraux, dont 13 avec des Adénovirus recombinants et 8 avec des

virus associés à l'Adénovirus (AAV). Les vecteurs non viraux, uniquement des lipides cationiques, sont utilisés dans 10 essais. Dans tous ces essais, les protocoles prévoient l'administration des particules ADN/vecteur par les voies aériennes.

Dans le cas des cancers du poumon, les essais cliniques réalisés sont au nombre de 48 dont 35 sont en phase I, 12 en phase II et un seul en phase III. La grande majorité de ces essais (42) concerne des carcinomes non à petites cellules. Les vecteurs viraux sont utilisés dans 33 essais (24 avec l'Adénovirus) et les vecteurs synthétiques (exclusivement des lipides cationiques) dans seulement 8. La majorité de ces protocoles prévoit une administration intratumorale ou sous-cutanée dans le cas d'une vaccination. Seuls deux essais concernent une lipofection par voie intraveineuse.

Les vecteurs synthétiques sont encore peu utilisés (8,6 % des essais). Ils représentent pourtant une voie alternative aux virus qui, bien qu'atténués, conservent un caractère immunogène et une capacité d'intégration dans le génôme par recombinaison. Les vecteurs synthétiques, bien que présentant potentiellement de nombreux avantages, sont à l'heure actuelle loin d'égaliser les capacités de transfection des vecteurs viraux et nécessitent encore de nombreuses recherches.

III LES VECTEURS POUR LA THÉRAPIE GÉNIQUE.

De nombreuses méthodes virales et non virales ont été développées afin d'augmenter la perméabilité des acides nucléiques vis-à-vis des membranes cellulaires.

Les vecteurs viraux de part leur efficacité ont permis de confirmer le concept de thérapie génique et ses potentialités. Ils ont comme principal avantage leur grande capacité de transfection mais ils présentent des problèmes d'immunogénicité (voir les revues de Johnson, 1995; Mountain, 2000). Les vecteurs non viraux sont eux plus sûrs mais moins efficaces.

A| Les vecteurs viraux.

Les virus ont évolué depuis des millions d'années pour atteindre leur cellule cible, y pénétrer et y exprimer leur matériel génétique. D'où l'idée de mettre au point des vecteurs à partir de virus. Pour des raisons de sécurité et d'efficacité, ces virus sont modifiés, de telle sorte qu'ils deviennent incapables de se multiplier. L'utilisation de vecteurs viraux pour transférer des cellules présente des limitations immunologiques, sécuritaires pour les patients ou de production.

La présentation d'antigènes viraux à la surface des cellules infectées peut conduire à la destruction des cellules transfectées par les lymphocytes T cytotoxiques et le développement indésirable de maladies auto-immunes (Yang *et al.*, 1994). De plus, l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte, peut engendrer l'activation de proto-oncogènes ou, au contraire, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Gunter *et al.*, 1993).

Il existe également des limitations techniques et des difficultés de reproductibilité pour obtenir de forts taux de production des virus dans les cellules infectées. L'utilisation de virus oblige à insérer dans leur génôme un acide nucléique spécifique (ADN ou ARN) de taille réduite (< 8 kpb). Enfin, la spécificité des virus pour un type cellulaire leur confère un manque de polyvalence.

Ces différentes limitations sont à l'origine de la plupart des problèmes rencontrés aujourd'hui avec les vecteurs viraux. Plusieurs types de vecteurs viraux recombinants dérivant principalement des adénovirus (Fisher *et al.*, 1996; Mitani et Kubo, 2002), des virus associés aux adénovirus (Kotin, 1994; Halbert *et al.*, 2001; Halbert et Miller, 2004), du virus *herpes simplex* (Leib et Olivo, 1993; Heister *et al.*, 2002), du virus de la *vaccine* (Harrington *et al.*, 2002), des rétrovirus (Miller *et al.*, 1990; Anderson, 1998) ou encore des lentivirus (Medina *et al.*, 2003) ont été développés ces dernières années. Les dernières générations de virus recombinants ne conservent plus que quelques gènes de leur génôme et se sont montrés efficaces pour délivrer des gènes et conduire à des expressions transgéniques élevées.

Les vecteurs viraux tiennent jusqu'à présent une place importante dans les essais cliniques. Comme nous l'avons vu, une certaine dangerosité reste associée à ces vecteurs (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Cependant, des vecteurs synthétiques non immunogènes, dont la synthèse est parfaitement contrôlée, dont la production en grande quantité est facile et qui pourraient transférer des plasmides de grande taille (> 10 kpb) seront nécessaires pour contrebalancer les limitations d'utilisation des vecteurs viraux.

B| Les vecteurs synthétiques.

Un vecteur synthétique de transfert de gènes adapté à une intervention thérapeutique doit pouvoir imiter les capacités des virus à introduire un gène dans une cellule.

La compréhension des mécanismes d'invasion de la cellule par le virus a permis d'identifier les composants essentiels pour assembler de tels vecteurs. En outre, on peut imaginer remplacer les éléments d'origine virale par des éléments synthétiques de fonctions identiques mais de nature différente. La synthèse chimique et ses possibilités quasi illimitées ont permis d'ouvrir un nouveau champ d'investigation.

Ces vecteurs synthétiques doivent présenter plusieurs caractéristiques :

- ◆ Compacter l'ADN.
- ◆ Protéger le gène exogène.
- ◆ Pénétrer sélectivement dans les cellules cibles.
- ◆ Échapper à la dégradation extracellulaire et intracellulaire pour introduire le gène exogène dans le noyau cellulaire.
- ◆ Permettre l'accessibilité du gène à la machinerie nucléaire de transcription.

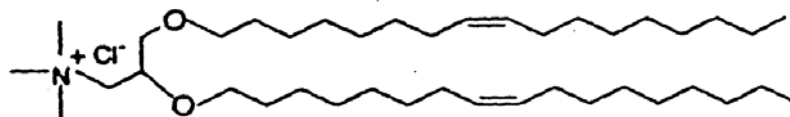
L'ADN est une macromolécule polyanionique que rien ne prédispose à traverser une membrane cellulaire présentant de nombreuses charges négatives. De plus, la taille du plasmide de plusieurs milliers de paires de bases peut être comparable à celle de la cellule. Ce problème peut être résolu en compactant le plasmide grâce des molécules polycationiques. Cette compaction le protège également de la dégradation par les nucléases. Pour que le plasmide soit internalisé spécifiquement, le vecteur doit contenir un signal reconnu par des récepteurs spécifiques capables d'induire une endocytose. De plus, le vecteur doit posséder un signal de translocation cytosolique permettant de franchir la membrane plasmique et/ou celle des vésicules d'endocytose pour délivrer le plasmide dans le cytosol. Enfin, pour favoriser la pénétration du plasmide dans le noyau cellulaire, un signal de localisation nucléaire (NLS) porté par le plasmide peut être ajouté. Une fois que le plasmide a pénétré dans le noyau, il est possible de favoriser l'expression du gène grâce à des promoteurs ou des enhanceurs.

Pour prolonger l'expression du gène, un gène codant pour une intégrase peut être également utilisé pour intégrer le gène dans le génôme. L'intégrase du phage Φ C31 a, par exemple, permis une intégration du transgène et son expression après un mois de culture (Quenneville *et al.*, 2004). Une autre méthode consiste à utiliser un transposon. Un transposon est une séquence d'ADN bordée par des éléments de séquence d'insertion à chacune de ses extrémités (appelées IS) et capable de se déplacer dans le génôme en s'intégrant au niveau d'une séquence cible. Le transposon « sleeping beauty » est très utilisé en thérapie génique (Liu *et al.*, 2004; Hackett *et al.*, 2005).

De nombreux efforts ont été réalisés pour mettre au point des systèmes de transfert de gènes en utilisant des complexes ADN/lipides cationiques (lipoplexes) ou des complexes ADN/polymères cationiques (polyplexes). Une présentation très brève des lipides cationiques sera donnée ci-dessous et on s'attachera d'avantage à la description des polymères cationiques que j'ai plus particulièrement utilisés.

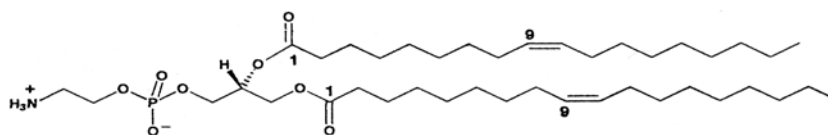
1) Les lipides cationiques.

Ils ont été développés pour la première fois par Felgner en 1987 avec le DOTMA (1,2-dioléoyloxypropyl-3-triméthylammonium) (Felgner *et al.*, 1987). Aux lipides cationiques sont associés des lipides neutres qui peuvent avoir des propriétés fusiogènes (DOPE) vis à vis des membranes cellulaires ou de consolidation des liposomes (cholestérol). La lipofectine est une solution de liposomes cationiques constituée d'un phospholipide neutre fusiogène (la dioléoylphosphatidyléthanolamine ou DOPE) et d'un lipide cationique (le 1,2-dioléoyloxypropyl-3-triméthylammonium ou DOTMA) dans un rapport massique 1/1 (figure 1).



DOTMA

Chlorure de N-[1-(2,3-Dioléoyloxy)propyl]-N,N,N triméthylammonium



DOPE

Dioléoyl L-α-phosphatidyléthanolamine

Figure 1: Formule chimique du DOTMA et du DOPE.

L'ADN en solution réagit spontanément avec les liposomes cationiques pour former des complexes ADN/liposomes cationiques (lipoplexes) capables de transférer de façon stable ou transitoire différents types cellulaires. Ces complexes ont des tailles comprises entre 300 et 500 nm.

Depuis, de nombreux lipides cationiques ont été synthétisés (Zhang *et al.*, 2004). Une liste non exhaustive est donnée dans le Tableau 3. Dans le Tableau 4, nous avons également regroupé un certain nombre de liposomes cationiques commercialisés.

Tableau 3: Lipides cationiques.

Abréviation	Nom chimique
DODAB	Bromure de dioctadecyldiméthylammonium
DOTMA	Chlorure de N-[1-(2,3-Dioléoyloxy)propyle]-N,N,N-triméthylammonium
DOTAP	1,2-Dioléoyloxy-3-(triméthylammonio)propane
DMRIE	Bromure de 1,2-Dimyristoyloxypropyle-3-diméthylhydroxyéthylammonium
DOSPA	Acide trifluoroacétique de 2,3-Dioléoyloxy-N-[2-(sperminecarboxamido)éthyle]-N,N-diméthyle-1-propanaminium
GAP-DLRIE	Bromure de (±)-N-(3-aminopropyle)-N,N-diméthyl-2,3-bis(dodecyl oxy)-1-propanaminium
DORI	Bromure de 1,2-Dioléoyloxypropyle-3-diméthylhydroxyéthylammonium
EDMPC	Chlorure de 1,2-Dimyristoyloxy-sn-glycéro-3-éthylphosphocholine
DOGS	Dioctadecylamidoglycospermine
DC-Chol	3 β-[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)carbamoyle] cholestérol
BGTC	Bis-guanidinium-tren-cholestérol
DPPES	Dipalmytoylphosphatidyléthanolamidospérmine
ELMPC	Chlorure de 1,2-Dilauroyle-sn-glycéro-3-éthylphosphocholine
EOMPC	Chlorure de 1,2-Dioléoyloxy-sn-glycéro-3-éthylphosphocholine
DODAC	Chlorure de Dioléoyldiméthylammonium
DOTIM	Chlorure de 1-[2-(Oléoyloxy)-éthyle]-2-oléoyloxy-3-(2-hydroxyéthyle)imidazolinium
DOSPER	Acétate de 1,3-Dioléoyloxy-2-(6-carboxyspermyle) propylamide 4
SAINT-n	Une série de dialkyle pyridinium-alkyles halides

D'après Templeton et Lasic, 2000.

Tableau 4: Liposomes cationiques commercialisés.

Nom	Composition	Fournisseur
Lipofectine	DOTMA:DOPE 1/1 m/m	Gibco BRL
DOTAP	DOTAP	Roche
LipofectAmine	DOSPA:DOPE 3/1 m/m	Gibco BRL
Transfectame	DOGS	ProMega
LipofectAce	DODAB:DOPE 0,5/5 m/m	Gibco BRL
DC-Chol	DC-Chol:DOPE 3/2 m/m	Sigma
DOTAP:Chol	DOTAP:Chol 1/1 m/m	Sigma
Transfectall	Cholestéryl-spermidine	Apollon
Clonfectine	Dimiristoyle-amidine	Clontech

D'après Templeton et Lasic, 2000.

La plupart de ces lipides cationiques sont constitués d'un corps de type glycérol substitué par deux chaînes d'acides gras en C14, C16 ou C18 insaturés ou saturés constituant la partie hydrophobe. La tête hydrophile mono cationique est le plus souvent un ammonium quaternaire qui permet d'interagir avec les charges négatives portées par les phosphates de l'ADN. D'autres lipides cationiques de type phospholipide tels que les phosphonolipides (GLB43) (Floch *et al.*, 2000) et les lipophosphoramides (KLN-5) (Montier *et al.*, 2004b) ont été développés.

Des cholestérols cationiques, le 3 β -[N-(N",N'-diméthyllaminoéthane) carbanoyl] cholestérol ou DC-Chol (Gao et Huang, 1991), le bis-guanidinium-spermine-cholestérol ou BGSC, le bis-guanidinium-trencholestérol ou BGTC et le bis-guanidinium-diacétylène ou BGDA forment également des vecteurs efficaces lorsqu'ils sont associés au DOPE (Vigneron *et al.*, 1996; Pitard *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 2001).

Les lipopolyamines sont des produits de la substitution de lipides avec de la spermine ou de la polylysine. Ils peuvent interagir avec l'ADN grâce à leurs charges cationiques multiples pour le condenser. Les travaux de Behr (1989) sur la dioctadecyl-amidoglycyl-spermine (DOGS) ou sur la dipalmitoyl-phosphatidyl-éthanolamido-spermine (DPPES) rendent compte de l'efficacité des lipopolyamines. D'autres travaux complémentaires ont montré la capacité des complexes plasmide/DOGS ou plasmide/DPPES à transférer transitoirement plusieurs types cellulaires (Demeneix *et al.*, 1994). La polylysine de faible degré de polymérisation (20 résidus) substituée par du N-glutaryl-1, 2-dioléoyl-phosphatidyl-éthanolamine, est également efficace dans le transfert de gènes dans les cellules adhérentes (Zhou *et al.*, 1991). Cependant, les lipopolyamines sont cytotoxiques lorsqu'elles sont utilisées à concentrations élevées (Staedel *et al.*, 1994).

Des études *in vivo* ont montré une efficacité de certains de ces vecteurs pour transférer les poumons après une administration systémique. Citons notamment le DOTAP et le mélange GL67/DOPE qui transfectent les poumons et en particulier les pneumocytes de type II au niveau des alvéoles (Bragonzi *et al.*, 2000). D'autres liposomes, comme le DOGS/DOPE, permettent de transférer les poumons mais aussi le foie et la rate. Le transgène s'exprime de façon diffuse dans tous ces tissus (Thierry *et al.*, 1995). Les phosphonolipides sont également efficaces pour transférer les poumons (Floch *et al.*, 2000; Delepine *et al.*, 2002).

Après une injection dans le sang, les lipoplexes sont rapidement recouverts par des protéines et des lipoprotéines chargées négativement. Ce manteau protéique réduirait les interactions entre les lipoplexes et les cellules endothéliales, ce qui diminuerait du même coup leur efficacité de transfection (Tandia *et al.*, 2003).

Les lipides cationiques sont moins immunogènes que les vecteurs viraux mais pour certains, une toxicité a été relevée (Scheule *et al.*, 1997). L'effet antitumoral de lipoplexes

ADN/DOTAP/Chol observé serait dû à l'inflammation provoquée par ces complexes administrés en i.v (Dow *et al.*, 1999). Les auteurs de cette étude observent une sécrétion d'IL-12 qui active les cellules NK et provoque leur accumulation dans les poumons. Ces cellules secrètent de l'interféron γ et sont ainsi les principales médiatrices de l'effet antitumoral.

Les lipoplexes résultent du mélange d'un plasmide avec des liposomes cationiques. La structure des complexes obtenus n'est pas toujours connue. Les études ont montré que l'ADN est pris en sandwich entre deux couches de lipides. Dans le cas des liposomes DOGS/DOPE, il a même été montré la formation de vésicules de structure en oignon avec l'alternance d'une couche d'ADN et d'une couche de lipides (Thierry *et al.*, 1997).

Des stratégies consistant à encapsuler le plasmide dans une vésicule lipidique ont été également développées (Nicolau et Cudd, 1989; Perrie et Gregoriadis, 2000). Cependant, la formation de ces vésicules est plus difficile que le simple mélange ADN, lipides cationiques.

2) Les polymères et peptides cationiques.

2.1) La polylysine.

Les interactions électrostatiques entre les charges négatives de l'ADN (phosphates des nucléotides) et les charges positives de la polylysine (groupement ϵ -amino de la polylysine) permettent une condensation de l'ADN ainsi que la neutralisation de 90% des charges négatives. Les complexes électrostatiques ainsi formés sont appelés polyplexes. Ce processus de condensation mal connu est réversible, se réalise en solution aqueuse et permet à un plasmide de plusieurs milliers de paires de bases de former des particules d'une centaine de nanomètres.

La charge globale des polyplexes est caractérisée par le potentiel ζ des particules. Du point de vue morphologique, les polyplexes forment des particules sphériques, des toroïdes ou des bâtonnets dans des conditions de faible force ionique. Dans les conditions de force ionique physiologique, ils forment de gros agrégats. La taille théorique d'un complexe monomoléculaire entre un plasmide de 6,4 kpb et la polylysine est de 28 nm. Cette estimation tient compte du volume spécifique partiel et de l'hydratation de l'ADN et de la polylysine (Mahato, 1999). Ces conditions sont rarement obtenues et les polyplexes adoptent en général une taille de 70-100 nm. La Figure 2 correspondant à une analyse en microscopie électronique par transmission de la formation des polyplexes entre un plasmide linéaire et un conjugué de la polylysine (Erbacher *et al.*, 1997), montre qu'en augmentant la quantité de polymère, on condense totalement l'ADN en une particule de forme toroïde d'une centaine de nanomètres (Figure 2d). Les images obtenues avec des quantités de polymère ne permettant pas une condensation totale de l'ADN montrent que dans cette particule quatre molécules de plasmide sont en cours de condensation (Figure 2a et 2b). Ceci est visible par la présence de plusieurs (au moins 8) extrémités de plasmide. Des résultats obtenus en utilisant la spectroscopie de corrélation de fluorescence ont montré que la condensation d'un plasmide avec la polyéthylèneimine (PEI) conduit à la formation de complexes renfermant au moins 3 ou 4 molécules de plasmide (Clamme *et al.*, 2003).

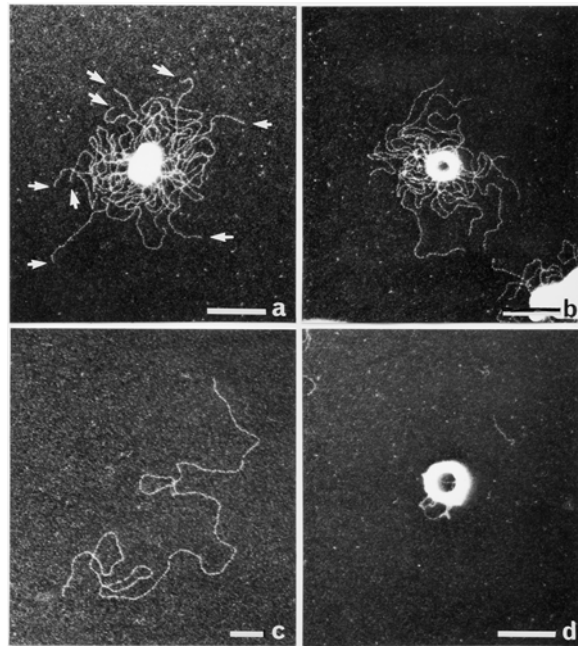


Figure 2: Formation de polyplexes en présence de polylysine gluconoylée.

Le panel (c) est un plasmide linéaire et le panel (d) illustre le polyplexe de forme toroïde obtenu après condensation totale du plasmide avec la polylysine gluconoylée. Les panels (a) et (b) correspondent à des molécules d'ADNp en cours de condensation et les flèches indiquent des extrémités de brins d'ADNp. Les observations ont été réalisées avec un microscope électronique à transmission. Reproduction tirée de Midoux *et al.*, 2002.

Échelle = 100 nm.

Cependant, il a été rapporté que l'obtention de polyplexes ADN/polylysine ne renfermant qu'une seule molécule d'ADN est possible mais le protocole de formation de ces polyplexes unimoléculaires présente plusieurs ambiguïtés et ne semble pas simple d'utilisation (Perales *et al.*, 1997). En effet, dans les conditions de formation décrites par ces auteurs, la concentration finale en NaCl est largement supérieure à la concentration physiologique.

La polylysine s'est montrée relativement efficace pour la transfection *in vitro* à condition d'ajouter des molécules capables de déstabiliser les membranes des vésicules intracellulaires comme la chloroquine (Erbacher *et al.*, 1996), le glycérol (Zauner *et al.*, 1997) ou des peptides fusiogènes (Wagner, 1999).

Les peptides anioniques riches en acide glutamique.

Des peptides induisant une déstabilisation des membranes en milieu acide sont de bons candidats pour permettre la libération de l'ADN dans le cytosol à partir des vésicules d'endocytose. Les premiers peptides utilisés ont été des peptides dérivés de la séquence N-terminale de la sous unité HA-2 de l'hémagglutinine du virus de la grippe connue pour être impliquée dans la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane des endosomes (White, 1990; Wagner, 1999).

Il a été ainsi montré que les peptides anioniques amphiphiles GLFEAIAGFIENGWEGMIDGGGC et GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCA (E5CA) peuvent augmenter respectivement l'efficacité de transfection des polyplexes ADN/transferrine/polylysine (Wagner *et al.*, 1992) et des polyplexes ADN/polylysine lactosylée (Midoux *et al.*, 1993). Ensuite, plusieurs autres peptides anioniques amphiphiles ont été synthétisés comme nous le montre le Tableau 5.

Ces peptides non structurés à pH neutre, prennent une conformation en hélice α à pH voisin de 5,5 suite à la protonation des résidus glutamiques ou aspartiques, facilitant ainsi leur interaction avec la membrane et sa déstabilisation.

Tableau 5: Peptides fusiogènes riches en acides glutamiques.

Séquences peptidiques	Nom	Références
GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG (X31F/68 strain)	HA-2	White, 1990
GLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYG (A/PR/8/34 strain)	HA-2	Murata <i>et al.</i> , 1987
GLFEAIAAGFIENGWEGMIDGGGC		Wagner <i>et al.</i> , 1992
GLFEAIEGFIENGWEGMIDGGGC	INF3	Plank <i>et al.</i> , 1994
(INF3)-SS-(INF3)	INF3DI	Plank <i>et al.</i> , 1994
GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG	INF7	Plank <i>et al.</i> , 1994
GLFEAIEGFIENGWEGnIDGCA	INF4	Plank <i>et al.</i> , 1994
(INF4)-SS-(INF4)	INF4DI	Plank <i>et al.</i> , 1994
GLFEAIEGFIENGWEGnIDG-K-GDInGEWGNEIFGEIAEFLG	INF5	Plank <i>et al.</i> , 1994
GLFEAIAEFIEGGWGELIEGCA	E5CA	Midoux <i>et al.</i> , 1993
GLFEAIAEFIEGGWGELIEGWYG	E5WYG	Midoux <i>et al.</i> , 1998
GLFHAI AHFIHGGWHGLIHGWYG	H5WYG	Midoux <i>et al.</i> , 1998
(E5WYGG) ₂ -KA		Kichler <i>et al.</i> , 1999
(E5WYGAA) ₂ -KA		Freulon <i>et al.</i> , 2000
WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA	GALA	Haensler et Szoka, 1993
GLFEALLELLESLWELLLEA	JST-1	Gottschalk <i>et al.</i> , 1996
NPVENYIDEVLNEVLVVPNININSSNC	VP1	Zauner <i>et al.</i> , 1995

Les abréviations correspondent à A : β -alanine, n: norleucine et -SS- : ponts disulfures. D'après Midoux et Pichon, 2002.

Dans la protéine de fusion, le peptide fusiogène HA-2 interagit avec la membrane cible sous forme de trimère. Le trimère formé passe au travers des deux membranes pour créer un canal permettant la libération des particules virales (Danieli *et al.*, 1996). Afin d'imiter cet arrangement spatial, des dimérisations de peptides ont été réalisées comme par exemple la dimérisation de INF3 grâce à des ponts disulfures formés entre 2 cystéines en position C-terminale (INF3DI), et l'homodimérisation du peptide E5WYG par un bras court (G)₂-K ou plus long (GAA)₂-K.

Des peptides totalement synthétiques tels que le GALA et JTS-1, ainsi que la séquence N-terminale du segment VP1 du rhinovirus HRV₂ ont permis également une augmentation de l'efficacité de transfection des polyplexes ADN/polylysine. Ces peptides anioniques peuvent présenter une diminution de leur pouvoir fusiogène une fois qu'ils sont liés covalamment à des polymères. Le peptide E5CA couplé à la SAB présente une altération de ses capacités perméabilisantes (Midoux *et al.*, 1995). De plus, pour la plupart, leur activité est fortement réduite en présence de SVF par suite de leur interaction avec des protéines sériques.

Les peptides cationiques.

Des peptides amphiphiles cationiques peuvent aussi être utilisés pour déstabiliser les membranes. Parmi eux, la melittine (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKR-KRQQ-NH₂) isolée du venin d'abeille *Apis mellifera* (Dempsey, 1990) présente un pouvoir de fusion/perméabilisation à pH neutre et acide plus important que les peptides anioniques. La

melittine a été couplée sur la polyéthylèneimine pour le transfert d'ADN (Ogris *et al.*, 2001b) et d'ARN (Bettinger *et al.*, 2001) et a révélé une bonne capacité à augmenter l'efficacité de transfection. Cependant, pour la plupart, ces peptides interagissent avec la membrane plasmique et présentent une cytotoxicité plus forte comparée aux peptides anioniques.

Les peptides riches en histidine.

Des peptides non chargés n'interagissant ni avec la membrane plasmique ni avec les protéines sériques mais ayant des propriétés fusiogènes après protonation en milieu acide sont d'un grand intérêt pour assurer le passage de l'ADN plasmidique au travers des compartiments intracellulaires. De tels peptides ou polypeptides peuvent être élaborés en utilisant l'histidine. En effet, la polyhistidine induit à pH légèrement acide la fusion et la perméabilisation de bicouches lipidiques après protonation des noyaux imidazoles (Wang et Huang, 1984).

Le peptide H5WYG (GLFHAI AHFIHGGWHGLIHG WYG) perméabilise les membranes cellulaires à pH 6,8 correspondant au pH des endosomes précoces. Cette valeur de pH est inférieure d'environ 1 unité à celle de l'analogue anionique, E5WYG. Contrairement aux peptides anioniques qui forment une hélice α en milieu acide, le peptide H5WYG ne s'organise pas en une telle structure ordonnée. L'utilisation de H5WYG à 10 μ M avec des polyplexes formés de polylysine glycosylée augmente significativement l'efficacité de transfection dans plusieurs lignées cellulaires (Midoux *et al.*, 1998). A l'inverse des peptides anioniques, l'effet du peptide H5WYG n'est pas altéré en présence de SVF.

L'utilisation d'auxiliaires de passage transmembranaire comme la chloroquine, le glycerol ou les peptides fusiogènes non inclus dans le complexe est difficilement applicable *in vivo*. De plus, la taille de la polylysine influence le temps de circulation sanguine et la biodistribution des complexes ADN/polylysine (Ward *et al.*, 2001). Des polylysines de 20 résidus fixent la protéine C3 du Complément et sont rapidement évacuées dans le foie contrairement à des polylysines de 211 résidus qui sont éliminées 20 fois moins vite. Cependant, ces résultats chez la souris ne sont pas corrélés à ceux obtenus chez le rat où les deux types de polyplexes sont rapidement éliminés de la circulation sans toutefois se fixer à la protéine C3. Ces polyplexes fixent également la protéine C3 humaine. Nous pouvons remarquer ici que ces différences de comportements de mêmes polyplexes dans la circulation sanguine entre différentes espèces animales peuvent expliquer les succès de transfection des poumons chez des modèles murins et les problèmes rencontrés lors d'essais cliniques. Une polylysine branchée de génération 6 a récemment été mise au point par Kawano et collaborateurs (2004). Ce vecteur fixe peu les composants du sérum et les cellules sanguines et a permis d'augmenter le temps de circulation dans le sang. Cette faible clairance est comparable à celle observée avec une polylysine couplée à un polyéthylène glycol (Mullen *et al.*, 2000).

2.2) Le chitosane.

Le chitosane ((1 \rightarrow 4) 2-amino-2-désoxy- β -D-glucose) est un polymère cationique de haut poids moléculaire, non toxique, biodégradable avec une faible immunogénicité obtenu par une déacétylation alcaline de la chitine présente dans la carapace des crustacés (Figure 3). Ce produit connaît de nombreuses applications dans des domaines très variés tels que la cosmétologie, la diététique, la pharmacologie, l'agriculture ou le traitement des eaux usées. Le chitosane est utilisé comme adjuvant pour l'administration de drogues (Agnihotri *et al.*, 2004) mais la première utilisation de ce polymère pour le transfert de gène date de 1995 (Mumper *et al.*, 1995).

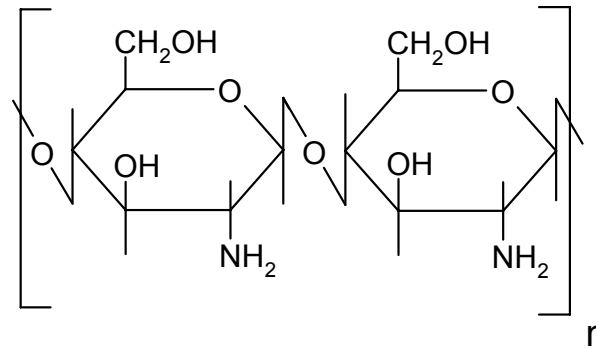


Figure 3: Structure du chitosane ou (1→4) 2-amino-2-désoxy-β-D-glucose.

L'efficacité de transfection *in vitro* du chitosane est comparable à celle de lipides comme la lipofectine (Ishii *et al.*, 2001) ou le DOTAP (Guang Liu et De Yao, 2002) mais reste 2 à 10 fois plus faible que la LipofectAMINE (Mao *et al.*, 2001). L'expression du transgène avec le chitosane est donc comparable à celle obtenue avec des lipides cationiques classiques avec l'avantage de la non toxicité (Koping-Hoggard *et al.*, 2001). Le chitosane permet également une expression du transgène comparable à celle de la PEI dans des cellules 293 (cellules de l'épithélium de rein humain) tout en étant moins toxique. Cependant, après une administration intratrachéale, son efficacité est moindre par rapport à la PEI.

Okamoto et collaborateurs (Okamoto *et al.*, 2003) ont introduit dans la trachée de souris une poudre de particules d'ADN et de chitosane préparée en utilisant du CO₂ supercritique (à plus de 74 bars et 31°C). Les auteurs constatent une transfection des poumons 5 fois plus élevée lorsque le chitosane est présent dans la poudre. Leurs résultats montrent également que l'administration des complexes ADN/chitosane sous forme de poudre est bien plus efficace que l'administration d'une solution de complexes.

Le chitosane peut également être utilisé comme adjuvant pour améliorer l'efficacité de transfection. Par exemple, le chitosane favorise l'interaction d'un adénovirus avec l'épithélium des voies aériennes en augmentant le temps de contact nécessaire à l'internalisation virale (Croyle *et al.*, 2001).

L'utilisation de polymères cationiques ayant également la capacité de déstabiliser les membranes en milieu acide tels que la PEI, les dendrimères, la polylysine histidylée ont apporté plus de simplicité dans la formation des complexes.

2.3) La polyéthylèneimine.

La polyéthylèneimine (PEI) est un polymère à haute densité de charges cationiques capable de condenser l'ADN plasmidique (Figure 4). Les polyplexes formés sont très efficaces pour transférer des gènes *in vitro* aussi bien dans les cellules adhérentes que non adhérentes (Boussif *et al.*, 1995). L'excès de charges cationiques de ces polyplexes favorise l'interaction non spécifique avec la membrane cellulaire. Cependant, un trop fort excès de charges cationiques dans les polyplexes induit une toxicité cellulaire importante due à la PEI libre qui représenterait 80% de la PEI totale (Clamme *et al.*, 2003). Cette toxicité peut être réduite en purifiant les polyplexes (Boeckle *et al.*, 2004).

Les polyplexes formés avec la PEI sont très efficaces pour transférer différents types cellulaires en absence d'auxiliaire de passage transmembranaire (Boussif *et al.*, 1995; Godbey *et al.*, 1999a). L'efficacité de ce polymère tient à ses capacités à condenser l'ADN et à neutraliser le pH acide des endosomes en piégeant les protons grâce à ses nombreux groupements azotés protonables à pH légèrement acide. Ceci induit une hypertonicité endosomique engendrant la lyse des endosomes et donc la libération de l'ADN dans le cytosol (Boussif *et al.*, 1995; Kichler *et al.*, 2001).

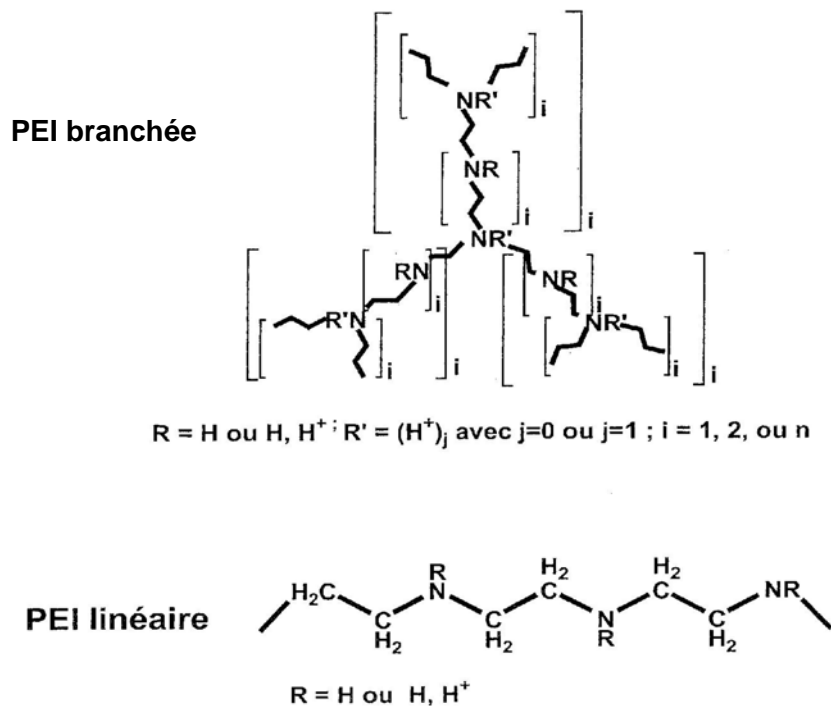


Figure 4: Structure de la PEI.

Différentes tailles de PEI ont été utilisées ainsi que des formes branchées ou linéaires.

Les différentes études *in vitro* ont montré que les complexes ADN/PEI, une fois fixés aux cellules, forment des amas qui sont ensuite internalisés. Godbey et collaborateurs (1999b) ont observé que la plupart de l'ADN présent dans le noyau est complexé à la PEI. Lorsque de l'ADN complexé à une PEI de 25 kDa est microinjecté dans le cytoplasme, la PEI permet le passage de l'ADN dans le noyau par rapport à l'ADN nu. Ce passage ne nécessite pas de division cellulaire même si la mitose peut le favoriser (Pollard *et al.*, 1998). Ces auteurs ont calculé que 1/100 des polyplexes injectés allaient dans le noyau. De plus, la cinétique d'expression du transgène après la transfection et la microinjection étant comparables, le trafic intracytoplasmique et le passage dans le noyau sont donc des étapes limitantes de la transfection.

Godbey et collaborateurs (1999a) ont transfecté des cellules endothéliales avec des PEI branchées de 600, 10000, 25000 et 70000 kDa et ont montré une relation proportionnelle entre l'efficacité de transfection, la mortalité cellulaire et la taille des PEI utilisées. De plus, l'augmentation de la taille des PEI favorise la sécrétion de tPA (tissue-type plasminogen activator), de PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type 1) et de vWF (von Willebrand factor), facteurs indicatifs du stress cellulaire.

L'efficacité de la PEI branchée de 25 kDa a été démontrée *in vivo* pour le transfert de gènes par aérosol dans les voies respiratoires afin de transfecter les cellules pulmonaires. Cette étude a signalé la spécificité du système et montré que 40% à 50% de l'expression du transgène subsistaient encore une semaine après la pulvérisation sans réaction d'inflammation aiguë. L'expression du transgène est détectée dans les cellules épithéliales de l'ensemble des voies aériennes jusqu'aux bronchioles terminales (Gautam *et al.*, 2001). De plus, une résistance du plasmide complexé à la PEI au processus de nébulisation a été observée contrairement aux lipides cationiques (Densmore *et al.*, 2000). Par contre, l'instillation de polyplexes formés avec la PEI linéaire de 22 kDa montrent une expression transitoire du transgène presque nulle après 72 h qui est corrélée avec une inflammation sévère du poumon dès 25 h (Uduehi *et al.*, 2001). Lors d'une application par les voies aériennes, le mucus

représente une barrière pour atteindre les cellules épithéliales cibles. Rudolph et collaborateurs (2002) ont montré que la fixation du polyéthylène glycol (PEG) sur la PEI permet d'inhiber les interactions entre les polyplexes PEI et le liquide de surface des voies aériennes et les protéines du plasma sanguin. Cependant, l'augmentation de la taille du copolymère PEG diminue l'efficacité de transfection. L'effet du PEG est opposé suivant le mode d'administration. Il augmente en effet l'efficacité de transfection lors d'une administration systémique mais la diminue lors d'une instillation intratrachéale.

L'administration systémique de polyplexes ADN/PEI a montré que le poumon était l'organe le plus transfecté mais que le cœur, les reins, le foie, la rate et le cerveau l'étaient également dans une moindre mesure (Goula *et al.*, 1998; Bragonzi *et al.*, 2000). La PEI linéaire de 22 kDa est la plus efficace *in vivo* et son efficacité de transfection est proportionnelle au rapport de charges +/- ou N/P (rapport des charges positives du polymère et des charges négatives des groupements phosphates de l'ADN) (Bragonzi *et al.*, 2000).

Récemment, des travaux ont révélé que les différentes formes de PEI utilisées dans le transfert de gènes peuvent avoir des efficacités de transfection variables et une biodistribution différente (Bragonzi *et al.*, 2000). En effet, après une administration intratrachéale, l'efficacité de transfection des polyplexes formés avec la PEI linéaire de 22 kDa et avec la PEI branchée de 25 kDa était similaire, mais les polyplexes formés avec la PEI linéaire de 22 kDa étaient distribués dans la région alvéolaire alors que ceux formés avec la PEI branchée de 25 kDa se localisaient plutôt dans les bronches. Ces polyplexes sont donc capables de traverser la barrière des surfactants.

Après une administration systémique, les polyplexes formés avec la PEI linéaire de 22 kDa étaient distribués dans les alvéoles et notamment les cellules endothéliales et les pneumocytes de type I et II alors que les polyplexes formés avec de PEI branchée de 25 kDa ne sont pas détectés dans le poumon. Il faut noter que, par ce mode d'administration, l'efficacité de transfection de la PEI linéaire de 22 kDa est supérieure à celle du DOTAP qui est le vecteur le plus efficace parmi les lipides cationiques (Goula *et al.*, 1998; Bragonzi *et al.*, 2000). Ces études montrent que les polyplexes formés de PEI linéaire de 22 kDa sont capables de traverser la barrière endothéliale et de transfecter les cellules sous-jacentes. Cependant, l'efficacité de transfection du poumon avec la PEI serait due à la formation d'agrégats participant au blocage des polyplexes au niveau des poumons (Chollet *et al.*, 2002).

La PEI peut être substituée par des ligands comme la transferrine pour un transfert de gènes ciblé (Kircheis *et al.*, 1997; Ogris *et al.*, 1999). Notamment, la transferrine-PEI a été utilisée pour transférer des gènes *in vivo* dans des tumeurs (Kircheis *et al.*, 2001a; Kircheis *et al.*, 2002). De plus, d'autres travaux encourageants ont montré qu'il était possible de cibler les cellules tumorales en ajoutant de l'acide folique à de la PEI-PEG complexée à de l'ADN. En effet, il est connu que certaines cellules tumorales ont une surexpression des récepteurs à l'acide folique et l'ajout de ce ligand augmente de façon considérable la transfection de ces cellules (Guo et Lee, 1999). Dernièrement, de nouvelles formulations à base de PEI ont été développées afin d'augmenter la spécificité et l'efficacité de transfection en combinant des agents perméabilisants et des signaux d'importation nucléaire. Afin de limiter les interactions non spécifiques de ce polymère, la PEI a été couplée au PEG et à un peptide fusio-gène (Woodle *et al.*, 2001). La PEI a été aussi liée à du polyéthylène oxyde et couplée à des ligands polypeptidiques (Vinogradov *et al.*, 2002). Cette nouvelle formulation de la PEI s'est montrée efficace pour l'endocytose des polyplexes ainsi formés et pour le relargage de l'ADN dans le cytosol à partir des endosomes.

2.4) Les dendrimères.

Les dendrimères sont des polymères synthétiques fortement branchés de forme sphérique, synthétisés à partir d'un monomère polyfonctionnel sur lequel sont fixés d'autres monomères à chaque cycle réactionnel. Le nombre de cycle correspond à la génération du dendrimère. Après quelques générations, le dendrimère prend une forme sphérique, hautement ramifiée et plurifonctionnalisée grâce aux nombreuses fonctions terminales présentes en périphérie. Les dendrimères sont utilisés pour le transfert de drogues mais seuls les dendrimères cationiques sont capables de condenser l'ADN et peuvent être utilisés pour le transfert de gènes (Gillies et Frechet, 2005).

Les PAMAMs (polyamidoamines) sont des polymères uniformes en taille (10 Å à 130 Å) avec une forte densité d'amines primaires présentées en surface (Tomalia *et al.*, 2002). Leur efficacité dépend de la structure du polymère. Les dendrimères dits fracturés ont un pouvoir de transfection 50 fois supérieur à celui des dendrimères normaux ou intacts (Tang *et al.*, 1996).

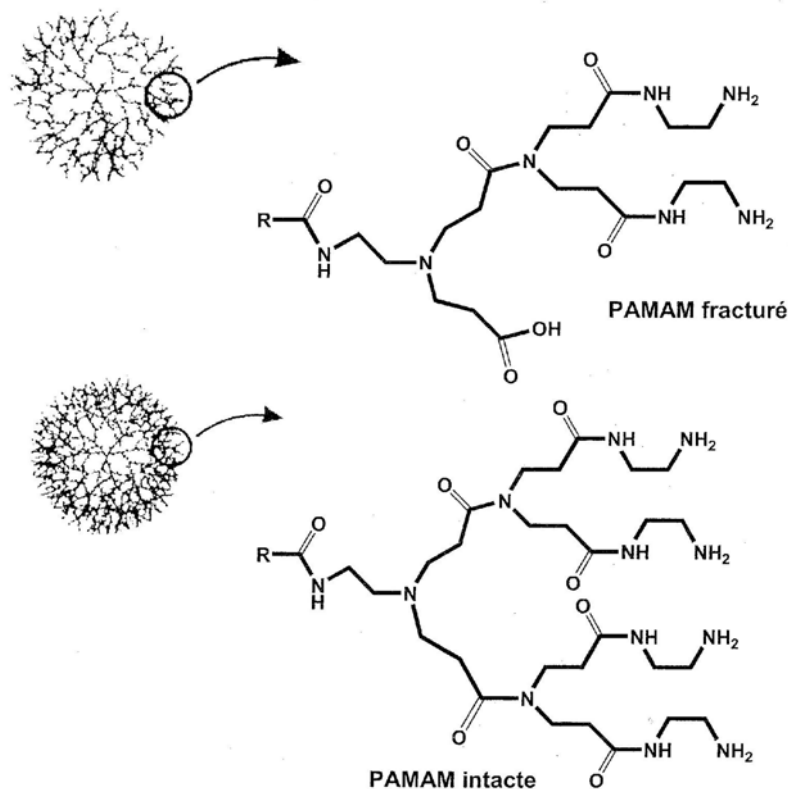


Figure 5: Structure des PAMAMs. D'après Tang et Szoka, 1997.

Les complexes PAMAM/ADN (Figure 5) sont aussi efficaces en transfection *in vitro* que les complexes polylysine/ADN (Behr, 1994) mais le PAMAM a l'avantage d'avoir une grande solubilité et une architecture définie. Les dendrimères de PAMAM ne sont pas immunogènes et peuvent être utilisés pour transférer des molécules d'ARN ou d'ADN sous forme de simple ou de double brin ainsi que des plasmides de taille variable (Bielinska *et al.*, 1996). Des polyplexes ADN/PAMAM ont été employés pour transférer des gènes *ex vivo* dans des transplants cardiaques murins (Wang *et al.*, 2000).

Les événements moléculaires et cellulaires impliqués dans la libération des polyplexes dans le cytosol à partir des endosomes restent spéculatifs et pourraient varier suivant les types

cellulaires. L'efficacité de transfection des complexes ADN/dendrimères peut être augmentée par addition de chloroquine. Un autre rôle potentiel du PAMAM chargé positivement est sa capacité à agir comme une base faible modifiant l'acidification des compartiments endosomiques.

Différentes formulations de polyplexes formés de PAMAM ont été testées à ce jour. Des études faites *in vitro* et *in vivo* avec des conjugués anticorps/dendrimères ont montré qu'ils sont spécifiques et non toxiques (Konda *et al.*, 2001). L'injection intraveineuse d'un ADN complexé à un PAMAM de génération 9 permet une expression du transgène uniquement dans les poumons avec une localisation alvéolaire (Kukowska-Latallo *et al.*, 2000). Ainsi, les dendrimères PAMAM sont un moyen de transfert de gènes intéressant et de nombreuses applications se développent autour de ce vecteur cationique (Eichman *et al.*, 2000).

Récemment, des dendrimères de polypropylenimine et de leurs dérivés amines quaternaires ont été testés *in vivo* chez la souris (Schatzlein *et al.*, 2005). Seul le foie montre une expression du gène.

2.5) Les polymères et peptides riches en histidines.

Les résultats obtenus avec le peptide H5WYG (Midoux *et al.*, 1998) ont conduit à l'élaboration de la polylysine histidylée. Le polymère cationique ainsi obtenu avec la pLK₁₉₀ (HpK) combine à la fois les propriétés de condensation de l'ADN par la polylysine et la capacité de déstabilisation des membranes intracellulaires après protonation du noyau imidazole des histidines en milieu légèrement acide (Figure 6) (Midoux et Monsigny, 1999).

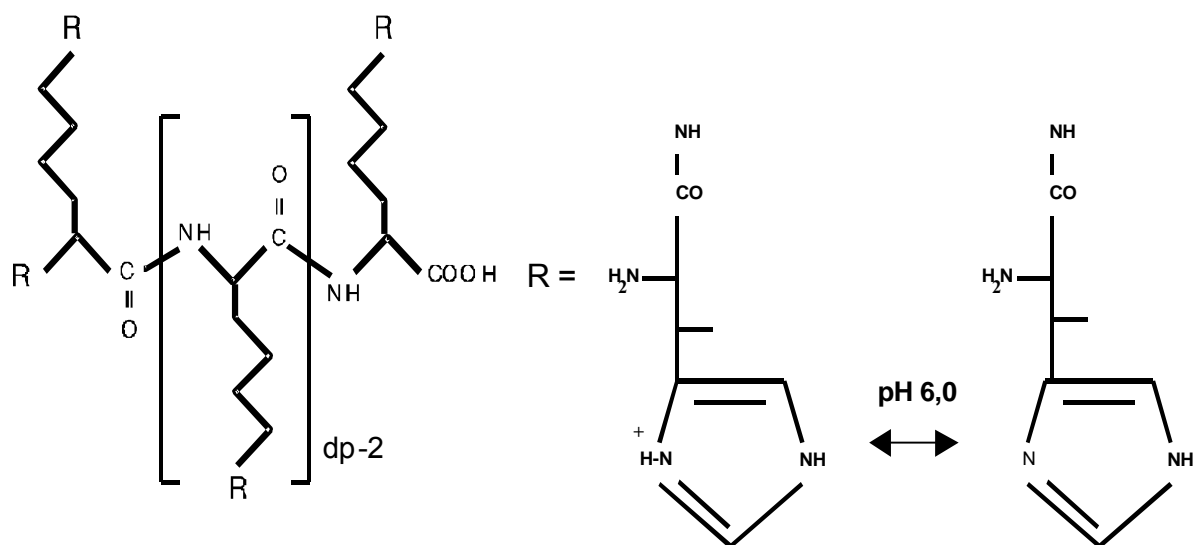


Figure 6: Structure de la polylysine histidylée. dp: degré de polymérisation. D'après Pichon *et al.*, 2001.

Basée sur l'activité luciférase d'un gène rapporteur, la transfection de cellules d'hépatocarcinome humain (HepG2) en culture avec HpK est 1000 à 10000 fois plus importante qu'avec des polyplexes à base de polylysine et ceci aussi bien en absence ou en présence de chloroquine ou de peptides fusiogènes. A pH neutre, les polyplexes histidylés formés dans un rapport de charges N/P de 3,4 ont un potentiel ζ de + 18 mV. A pH < 6, ils voient leur potentiel ζ augmenter jusqu'à + 40 mV du fait de la protonation des groupes

imidazoles (Bello Roufai et Midoux, 2001). Ceci suggère qu'une fois internalisés, une augmentation du nombre de charges cationiques peut se faire dans la lumière des endosomes engendrant ainsi une déstabilisation des membranes acide dépendante. L'efficacité de transfection avec HpK est fortement réduite en présence de Bafilomycine A1, un inhibiteur de l'ATPase H⁺ responsable de l'acidification des endosomes. Ce qui indique une implication des résidus histidines dans le processus de transfection et notamment dans le passage endosome cytosol.

L'efficacité de transfection avec la polylysine histidylée s'affaiblit avec la diminution du degré de polymérisation (dp) de la polylysine (Tableau 6). Cette variation est probablement la conséquence de la réduction du nombre de charges cationiques qui ne permet alors plus une bonne condensation de l'ADN plasmidique. De plus, les faibles interactions électrostatiques de ces petites polylysines histidylées avec l'ADN plasmidique peuvent induire la formation d'une solution de polyplexes où la quantité de polymère sous forme libre serait importante et cytotoxique.

Bien que la polylysine histidylée de dp 19 ne soit pas efficace pour le transfert de gènes, les oligolysines histidylées (HoK) fortement substituées en histidine (\geq de 80%) sont efficaces pour le transfert d'oligonucléotides (Pichon *et al.*, 2000).

Tableau 6: Influence du degré de polymérisation de la polylysine histidylée sur l'efficacité de transfection.

Dp	His (%)	RLU (%)	Cytotoxicité (%)
190	35	100	24
190	45	110	21
72	23	87-96	24
72	43	0-1	12
36	22	61-100	25
36	53	0-10	4
19	25	15-26	49
19	45	9	40

Les cellules HepG2 sont incubées 4 heures à 37°C en présence de polyplexes formés d'ADN plasmidique (pCMVLuc, 5 kpb) et des différents polymères. Après internalisation, le milieu de transfection est remplacé par du milieu de culture complet et les cellules sont incubées 48 heures à 37°C. L'efficacité de transfection est déterminée par mesure de l'activité luciférase dans les cellules au luminomètre.

L'efficacité de transfection est comprise entre 0 et 100 où 0 signifie une absence de transfection et 100 l'efficacité de transfection maximale enregistrée comparée à l'ADN seul.

Les abréviations dp et His sont respectivement, le degré de polymérisation et l'histidine. D'après la revue de Pichon *et al.*, 2001.

L'ADN plasmidique complexé à une polylysine de dp 190 substituée de 109 résidus histidine forme des toroïdes de diamètre moyen égal à 130 nm mesuré à la fois par diffusion de la lumière en milieu quasi élastique (QELS: Quasi Elastic Light Scattering) et par microscopie électronique à transmission. Cependant, dans les conditions de force ionique physiologiques, les polyplexes forment des agrégats. La taille de ces polyplexes peut être

stabilisée à 100 nm et à 50 nm en présence respectivement de 10% et 50% de SVF. De plus, la charge globale des polyplexes histidylés en présence de SVF passe à -25 mV, ce qui a pour conséquence une diminution des interactions non spécifiques avec la surface des cellules. Il a été décrit pour d'autres polymères cationiques en particulier la polyéthylèneimine (Erbacher *et al.*, 1999; Ogris *et al.*, 1999), que la fixation d'une molécule de polyéthylène glycol (PEG) de masse moléculaire 5000 Da par molécule de HpK empêche la formation d'agrégats dans les conditions physiologiques en sels et réduit le potentiel ζ à $+6$ mV (Figure 7a).

De façon similaire aux polyplexes ADN/HpK, la PEGylation des complexes oligonucléotide/HoK empêche l'agrégation (voir la revue de Pichon *et al.*, 2001). Les mesures de diffusion de la lumière en milieu quasi élastique et les images de microscopie électronique à transmission montrent que les complexes ODN/PEG-HoK forment des particules sphériques denses de 25 nm à 34 nm et de potentiel $\zeta +17$ mV qui restent stables en présence de 0,15 M en NaCl (Figure 7b).

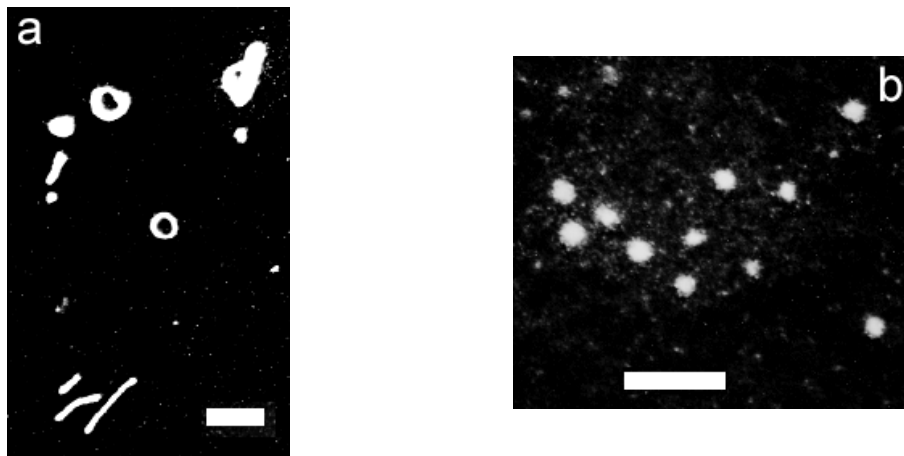


Figure 7: Images de microscopie électronique à transmission des polyplexes ADNp/PEG-HpK.(a) et des polyplexes oligonucléotide/PEG-HoK (b). Échelle = 100 nm.

Les observations ont été réalisées au microscope électronique à transmission. D'après Pichon *et al.*, 2001.

Depuis ces travaux, d'autres auteurs ont développé des polymères ou des peptides riches en histidine (tableau 7). Il a été synthétisé un polymère de N-Ac-poly(L-Histidine) greffé à de la polylysine (Benns *et al.*, 2000). Les travaux de Putnam et collaborateurs (2001) montrent également l'efficacité de la polylysine substituée par différentes quantités de noyaux imidazoles.

Tableau 7: Peptides riches en résidus histidines.

Séquences peptidiques	DBS	CTS	NLS	Références
HpK	+	+	-	Pichon <i>et al.</i> , 2001
CHKHKHHKHC; CHK ₆ HC	+	+	-	McKenzie <i>et al.</i> , 2000a
K ₂ AL ₂ ALALH ₂ LAHLALHLALALK ₂ A (LAH ₄)	+	+	-	Kichler <i>et al.</i> , 2003
[KHKH ₂ KH ₂ KH ₂ KH ₂ KH ₂ KH ₂] ₄ K ₃	+	+	-	Chen <i>et al.</i> , 2002
(CHHHHHHKKKHHHHHHC) _n (HIS6 RPC)	+	+	-	Read <i>et al.</i> , 2005

Les abréviations DBS, CTS et NLS correspondent respectivement à signal de fixation de l'ADN (DNA Binding Signal), signal de translocation cytosolique (Cytosolic Translocation Signal) et signal de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal). D'après Montier *et al.*, 2004a.

Très récemment, l'équipe de LW Seymour a notamment mis au point le polymère HIS6 RPC (CHHHHHHKKKHHHHHHC)_n (Read *et al.*, 2005). C'est un polymère d'une cinquantaine de monomères reliés par des ponts disulfures entre les cystéines. Chaque monomère étant trop court pour condenser l'ADN, la réduction des ponts disulfures induit un relargage de l'ADN du vecteur dans le cytosol. Ce polymère s'est montré plus efficace que la PEI branchée de 25 kDa tout en étant très peu toxique. Ce vecteur permet également le transfert d'ARNm et de siARN.

2.6) Les peptides cationiques.

2.6.1) Les peptides capables de compactés l'ADN.

L'équipe de Rice a développé une séquence de 18 lysines suivie d'un tryptophane et d'une cystéine alkylée, le AlkCWK₁₈ (Wadhwa *et al.*, 1997). Le peptide AlkCWK₁₈ (Tableau 8) est capable de condenser l'ADN en formant des particules de 78 nm et montre une bonne efficacité de transfection *in vitro* en présence de chloroquine. Comparé à une oligolysine de 19 résidus, le peptide AlkCWK₁₈ induit une compaction de l'ADN 40 fois plus importante et augmente l'efficacité de transfection de 1000 fois. Il a été supposé que ce pouvoir de compaction est lié à la présence du tryptophane plutôt qu'à la courte chaîne de lysine.

Cependant, McKenzie et collaborateurs ont montré sur des cellules en culture que les particules formées entre l'ADN et le peptide AlkCWK₁₈ étaient similaires à celles des complexes ADN/oligolysine K₂₀ et avaient une efficacité de transfection comparable (McKenzie *et al.*, 1999). De plus, l'incorporation de tryptophane dans les peptides de lysine (Kn)₂KGGC, d'arginine (Rn)₂KGGC, et d'ornithine (On)₂KGGC où n= 2, 3, ou 4 n'induit pas une augmentation de la compaction (Plank *et al.*, 1999). Comparés à la polylysine, ces peptides de faible masse moléculaire sont de faibles activateurs du système du complément. Les peptides formés de lysine, d'arginine, ou d'ornithine condensent l'ADN de façon analogue. Un minimum de 6 à 8 acides aminés basiques est nécessaire pour permettre la condensation et induire une efficacité de transfection.

Les peptides AlkCWK₁₈, YKAK₈WK et RAWA (Tableau 7) présentent de bonnes efficacités de transfection en présence de chloroquine ou du peptide fusio-gène JTS-1.

Tableau 8: Peptides permettant la condensation de l'ADN.

Séquences peptidiques	Aux	DBS	NLS	Références
AlkCWK ₁₈	Chlo	+	-	Wadhwa <i>et al.</i> , 1997
(K _n) ₂ KGGC; (R _n) ₂ KGGC; (O _n) ₂ KGGC	Chlo	+	-	Plank <i>et al.</i> , 1999
YKAK ₈ WK	JTS-1	+	-	Gottschalk <i>et al.</i> , 1996
RAWARALARALARALAR (RAWA)	JTS-1	+	-	Fominaya <i>et al.</i> , 2000
(KTPKKAKKP) ₂ (H9-2)	lipo	+	-	Schwartz <i>et al.</i> , 1999
PKKKRKV-βA-(KTPKKAKKP) ₂ (nls-H9-2)	lipo	+	+	Schwartz <i>et al.</i> , 1999
RRRLHRIHRRQHRSCRRRKRR (Pr21)	lipo	+	-	Schwartz <i>et al.</i> , 1999
SPKRSPKRSPKR-palmitoyl	HA	+	-	Wilke <i>et al.</i> , 1996
CWK ₁₇ C	Chlo	+	-	McKenzie <i>et al.</i> , 2000b

Les abréviations DBS and NLS correspondent respectivement à signal de fixation de l'ADN (DNA Binding Signal) et signal de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal). La colonne Aux indique qu'il faut ajouter un agent de passage transmembranaire vers le cytosol pour avoir une transfection efficace. Chlo et lipo correspondent respectivement à chloroquine et à lipides cationiques. D'après Midoux et Pichon, 2002.

De courtes séquences de peptides connues comme étant des sites de fixation à l'ADN peuvent également être utilisées pour condenser un plasmide. Dans ce domaine, l'équipe de Schermann a montré *in vitro* que le peptide dimérique H9-2 constitué de 19 résidus de lysine associé à la séquence KTPKKAKKP (résidus 152-160 de la séquence de l'histone H1 humain) en présence de lipides cationiques interagit avec l'ADN et augmente l'efficacité de transfection. De même, le peptide Pr21 dérivé de la protamine et riche en arginine (21 résidus) présente dans les cellules une efficacité de transfection similaire à celle obtenue avec le peptide H9-2. La séquence P2 (SPKRSPKRSPKR) correspondant à une répétition du motif (SPKR) trouvé dans l'histone H1 du sperme d'oursin est également capable de condenser l'ADN. L'addition d'une queue lipidique palmitoylée à cette séquence P2, induit *in vitro* la formation de particules qui associées au peptide fusogène E5C (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGC) permettent la transfection.

D'une façon générale, les peptides de faible masse moléculaire ont *in vitro* une efficacité de transfection similaire à celle des polymères cationiques correspondants. Cependant, la condensation de l'ADN est moindre ce qui conduit à la formation de complexes moins stables dans les liquides biologiques et moins protégés de la dégradation. Pour stabiliser les polyplexes hors de la cellule et notamment dans la circulation sanguine, des liaisons interpeptidiques par ponts disulfures peuvent être introduites entre les molécules de polymère une fois les polyplexes formés (Figure 8). Ces ponts disulfures qui pourront être rompus en milieu réducteur permettent après internalisation des polyplexes, une dissociation des polyplexes et une libération du plasmide dans le cytosol des cellules. Basés sur ce principe, des polyplexes ADN/polylysine préformés ont été liés par des ponts disulfures par addition d'un agent hétérobifonctionnel, le 3,3'-dithiobispropionimide (Trubetskoy *et al.*, 1999). Ces liaisons par ponts disulfures empêchent l'agrégation des polyplexes ADN/polylysine qui a lieu habituellement dans les conditions de force ionique physiologiques. De tels polyplexes se sont révélés efficaces pour transférer des cellules en culture.

McKenzie et collaborateurs (2000b) ont développé toute une panoplie de peptides cationiques dérivés du peptide AlkCWK18 contenant 2 à 5 résidus de cystéine. Les peptides CWK₁₇C, CWK₈CK₈C, CWK₅CK₅CK₅C et CWK₄CK₃CK₃CK₄C condensent l'ADN et forment des particules de 30 à 50 nm après stabilisation par des liaisons disulfures interpeptidiques (Figure 8). L'efficacité de transfection dans les cellules HepG2 et les cellules

COS-7 (cellules rénales du singe vert d'Afrique) avec ces peptides est augmentée de 5 à 60 fois en présence de chloroquine.

Peptide riche en résidus cystéine

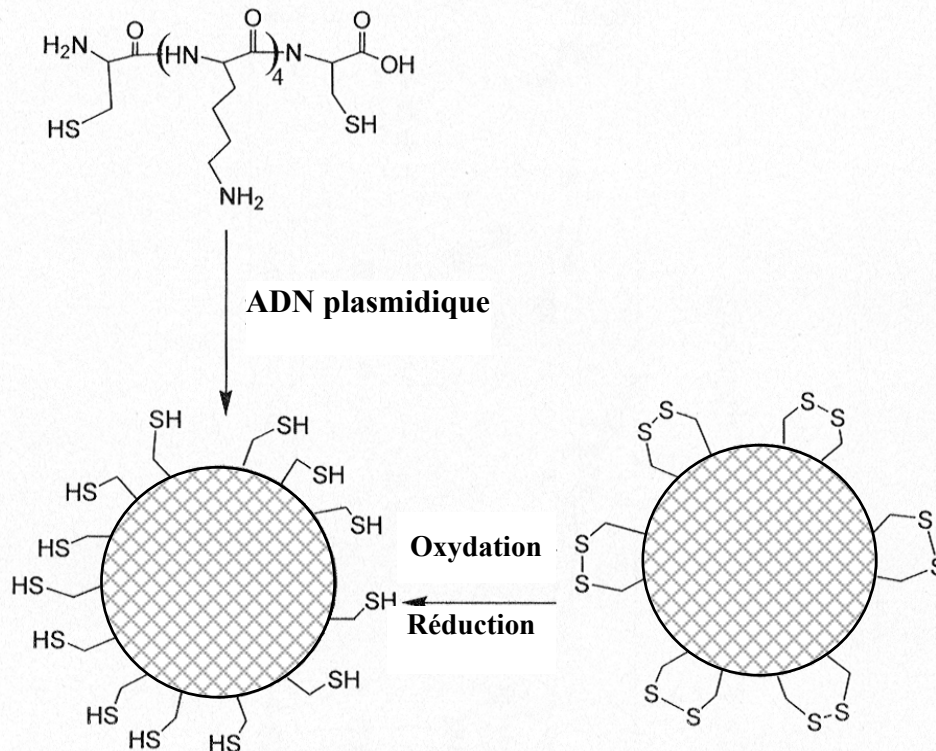


Figure 8: Stabilisation de polyplexes par formation de ponts disulfures interpeptidiques après oxydation des fonctions thiols. D'après McKenzie *et al.*, 2000b.

2.6.2) Les peptides cationiques permettant la condensation de l'ADN et le passage transmembranaire.

Les polymères cationiques sont des macromolécules hétérogènes en taille qui ont tendance à activer le système du Complément (Ogris *et al.*, 1999). Aussi, pour contourner ces problèmes, l'utilisation de peptides cationiques de faible masse moléculaire pourrait être préférable car ils offrent l'avantage d'être homogènes et mieux caractérisés. Ces peptides sont cationiques pour compacter l'ADN et amphiphiles pour induire une déstabilisation des membranes par perméabilisation ou par fusion.

Des peptides cationiques de petite taille possédant des résidus de lysine ou d'arginine se sont montrés tout aussi efficaces pour permettre la condensation de l'ADN en s'affranchissant de l'utilisation d'auxiliaire de passage transmembranaire. Parmi ceux-ci se trouvent le KALA, Hel 11-7 et le LARL₆ qui forment une hélice α en solution aqueuse à pH neutre et induisent une déstabilisation des membranes biologiques (Tableau 9). Ces peptides sont organisés de façon similaire en présentant une face hydrophile constituée de résidus polaires de lysine ou d'arginine et une face hydrophobe constituée de résidus apolaires non chargés (leucine ou alanine par exemple). La face hydrophile cationique permet l'interaction avec l'ADN. Il a été montré que le KALA induisait une augmentation de l'efficacité de transfection de 100 fois

comparé à la polylysine. En revanche, les peptides HeL-11-7 et LARL₆ induisent dans les cellules COS-7 une efficacité de transfection 10 fois inférieure à celle de la lipofectine.

Tableau 9: Peptides permettant la condensation de l'ADN et la déstabilisation des membranes biologiques.

Séquences Peptidiques	DBS	CTS	NLS	Références
WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA (KALA)	+	+	-	Wyman <i>et al.</i> , 1997
Ac-LARLLRALLRALLRALLRALLRAL-NH ₂ (LARL) ₆	+	+	-	Niidome <i>et al.</i> , 1999
KLLKLLLKLWKKLLKLLK (HeL-11-7)	+	+	-	Niidome <i>et al.</i> , 1999
GLFKALLKLLKSLWKLLLKA (ppTG1)	+	+	-	Rittner <i>et al.</i> , 2002
GLFEALLELLESLWELLLEA (ppTG20)	+	+	-	Rittner <i>et al.</i> , 2002

Les abréviations DBS, CTS et NLS correspondent respectivement à signal de fixation de l'ADN (DNA Binding Signal), signal de translocation cytosolique (Cytosolic Translocation Signal) et signal de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal). D'après Midoux et Pichon, 2002.

La première transfection *in vivo* utilisant uniquement des peptides comme vecteurs a été réalisée par Rittner et collaborateurs (2002). Ils ont montré que les peptides ppTG1 et ppTG20 permettent une transfection du poumon de souris 24 h après l'injection intraveineuse.

2.7) Autres polymères.

Verbaan et collaborateurs (Verbaan *et al.*, 2003) ont injecté en intraveineuse à des souris des complexes d'ADN et de pDMAEMAs (poly(2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate)). Ils ont observé que des complexes chargés positivement s'accumulaient dans les poumons et le foie et permettaient une expression dans le poumon alors que des complexes chargés négativement s'accumulaient uniquement dans le foie dans lequel aucune expression n'était détectée. Ces complexes positifs fixent l'albumine et les érythrocytes ce qui entraîne une agrégation des complexes et leur accumulation au niveau du poumon. Il semble que de tels agrégats n'empêchent pas l'expression du transgène.

D'autres auteurs ont mis au point des vecteurs amphiphiles constitués de trois blocs, un motif central de 30 unités de poly(propylèneoxyde) localisé entre des blocs de n unités de poly(éthylèneoxyde). Le PE6400 (n=13) permet une expression d'un gène dans les tissus musculaires (Pitard *et al.*, 2002). L'augmentation de l'expression par rapport à l'ADN nu est observée pour des gènes de 700 b à 3,4 kb. Le PE6400 et le Lutrol (n=75) ont également été utilisés chez la souris pour le transfert de gènes des voies aériennes (Desigaux *et al.*, 2005). Par instillation intratrachéale ou aérosolisation, le Lutrol est plus efficace que le PE6400. Il permet une expression de gène de 5 à 15 fois supérieure à celle obtenue avec une PEI de 25 kDa. De plus, l'expression est supérieure à 5 jours alors qu'un pic est observé au 1^{er} et 2^{ème} jour avec la PEI. Autre avantage, le Lutrol injecté seul ne provoque pas d'inflammation. Toutefois, une inflammation transitoire s'installe après instillation de complexes uniquement pour des quantités d'ADN élevées. Les études histologiques ont montré que les cellules alvéolaires et probablement les pneumocytes de type II expriment le transgène.

2.8) Le transfert de gènes ciblé.

Pour appliquer la thérapie génique *in vivo*, il est nécessaire d'adresser les gènes médicaments dans des types de cellules spécifiques pour éviter des effets secondaires non désirés dans les autres cellules. Trois méthodes sont considérées. La première stratégie cherche à prendre avantage de la physiologie particulière du tissu ciblé. En effet, la perméabilité des vaisseaux alimentant une tumeur est élevée (Sedlacek, 2001). Cette méthode sera abordée dans la partie III] C]. Une deuxième méthode consiste à favoriser l'expression du gène médicament grâce à des promoteurs ou enhanceurs spécifiques du type cellulaire ciblé. Nous ne traiterons pas ici cet aspect. La dernière méthode consiste à cibler des récepteurs spécifiques ou surexprimés à la surface des cellules cibles en intégrant au vecteur des molécules ligands.

Tableau 10: Ciblage de récepteurs spécifiques de l'endothélium pulmonaire après une administration systémique.

vecteur	récepteur	ligand	Références
Adenovirus	Anticorps	angiotensin-converting enzyme (ACE)	Balyasnikova <i>et al.</i> , 2005
PEI	PECAM (platelet endothelial cell adhesion molecule)	Anticorps anti PECAM	Li <i>et al.</i> , 2000
Adenovirus	Anticorps	angiotensin-converting enzyme (ACE)	Reynolds <i>et al.</i> , 2000
Adenovirus type 5	Récepteur du peptide GFE-1	CGFECVVRQCPERC (peptide GFE-1)	Trepel <i>et al.</i> , 2000
Anticorps	Antigène 90kDa (cavéoles pulmonaire)	Anticorps	McIntosh <i>et al.</i> , 2002
PEI	albondine	albumine	Orson <i>et al.</i> , 2000

Il est nécessaire de cibler l'endothélium pulmonaire pour permettre le passage transendothélial des vecteurs vers les cellules épithéliales mutées ou les cellules tumorales. Il existe plusieurs récepteurs surexprimés ou spécifiques de cet endothélium (Tableau 10).

Orson et collaborateurs (2000) ont montré qu'un polyplexe formé avec de la PEI couplée à de l'albumine sérique se retrouvait exclusivement dans les alvéoles pulmonaires de souris et permettait une expression du transgène par rapport au vecteur seul. Cependant, le poumon est le premier organe fonctionnant comme une barrière pour des particules injectées dans la queue de souris. Ces polyplexes ne seraient donc pas réellement spécifiques du poumon mais seraient arrêtés dans les microvaisseaux pulmonaires du fait de leur taille.

Des anticorps ont été produits contre l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Ces anticorps ont été fixés sur un adenovirus. Les conjugués Ad-Anticorps (ACE) s'accumulent 20 fois plus dans le poumon que les adénovirus non conjugués. L'expression du

transgène est également 20 fois supérieure et est diminuée de 80 % dans le foie (Reynolds *et al.*, 2000; Balyasnikova *et al.*, 2005). D'autres équipes utilisent cette méthode de ciblage des molécules spécifiques du poumon par des vecteurs couplés à des anticorps (voir le tableau 10) (Li *et al.*, 2000). McIntosh et collaborateurs (2002) ont directement utilisé un anticorps ciblant spécifiquement les cavéoles pulmonaires. Cet anticorps, appelé TX3.833, est capable de transcyter à travers les cellules endothéliales et d'atteindre les cellules épithéliales sous jacentes.

Trepel et collaborateurs (2000) ont mis au point une banque de peptides spécifiques d'organes et de tumeurs. Ils ont ainsi pu produire des anticorps dont les fragments Fab ont été couplés à un Adenovirus de type 5. Ces vecteurs recombinants permettent un ciblage du récepteur du peptide synthétique GFE-1 dans les poumons.

D'autres études montrent la possibilité de cibler les intégrines. En effet, certaines intégrines sont présentes préférentiellement dans les lignées de cellules tumorales pulmonaires (Costantini *et al.*, 1990; Feldman *et al.*, 1991). Chen et collaborateurs (2005) ont mis au point des peptides RGD cycliques qu'ils ont utilisé comme marqueurs de tumeurs pulmonaires positifs pour l'intégrine $\alpha\beta3$. Quelques études *in vitro* montrent l'efficacité de cibler ces récepteurs membranaires grâce à la fixation de peptides possédant un motif RGD sur la polylysine ou la polyéthylèneimine (Aoki *et al.*, 2001; Kunath *et al.*, 2003).

Les récepteurs de facteurs de croissance sont une autre cible intéressante pour le traitement du cancer (Cristiano et Roth, 1996; Frederiksen *et al.*, 2000). En effet, le récepteur de l'EGF est surexprimé dans les cancers du poumon (Hirsch *et al.*, 2003). Ainsi, un certain nombre de récepteurs ou d'antigènes sont à priori utilisables pour réaliser un ciblage des cellules endothéliales, épithéliales CF ou cancéreuses pulmonaires.

III] L'ENDOTHELIUM PULMONAIRE.

A] Biologie de l'endothélium pulmonaire.

1) Définition et structure de l'endothélium.

La circulation sanguine entre le cœur et les organes est assurée par un ensemble de vaisseaux qui sont les artères reliant le cœur aux organes et les veines reliant les organes au cœur. Les vaisseaux sanguins sont constitués de trois couches concentriques (Figure 9).

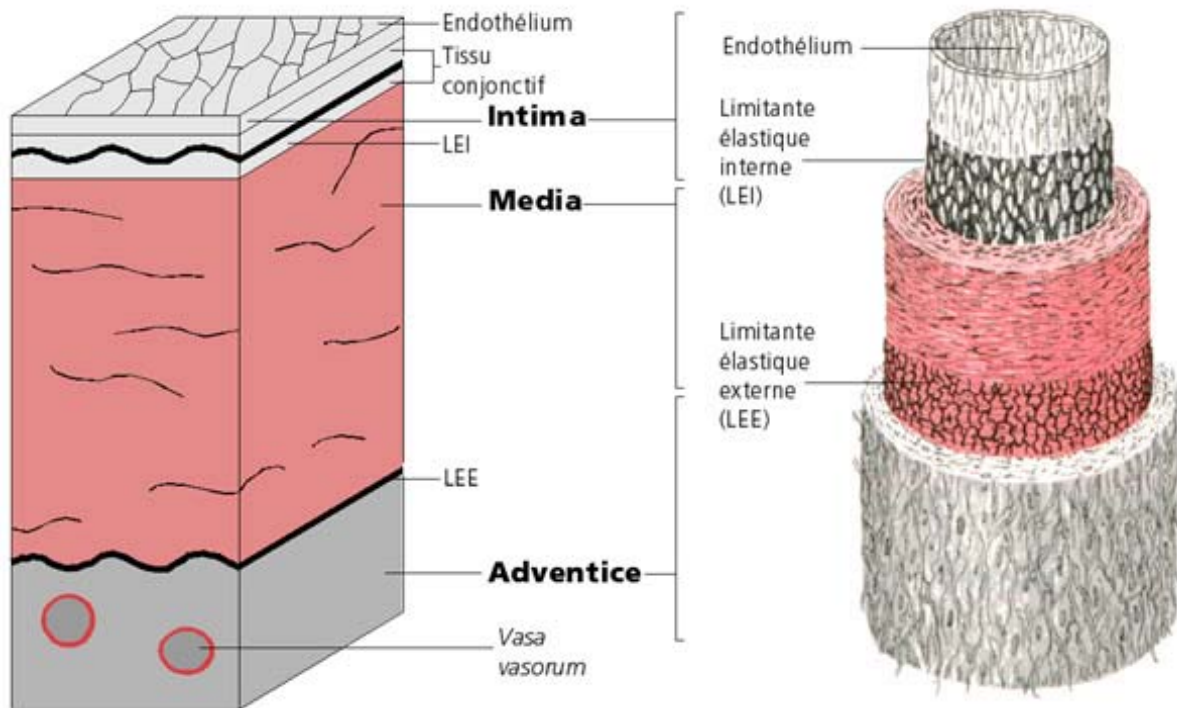


Figure 9: Structure d'une artère normale.

L'intima est formée par l'endothélium et de sa lame basale, la media de cellules musculaires lisses et/ou de fibres élastiques et l'adventice surtout de collagène et peu de cellules. Ces différentes couches sont plus ou moins importantes suivant la nature des vaisseaux (Figure 10).

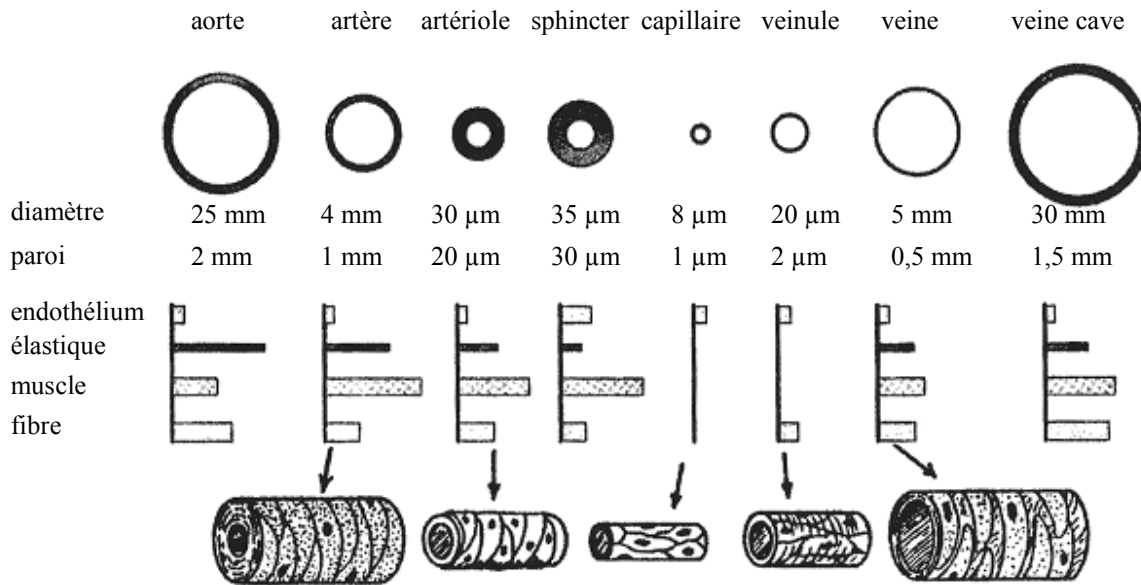


Figure 10: Taille et structure des vaisseaux sanguins. Les histogrammes représentent la proportion de l'endothélium, des fibres élastiques (« fibre ») et des cellules musculaires (« muscle ») dans la paroi. L'histogramme noir (« élastique ») représente l'élasticité du vaisseau.

Les grandes artères sont des artères élastiques car la média contient quasi uniquement des fibres élastiques. Les artères de plus petits calibres sont dites musculaires car la média contient plus de cellules musculaires lisses que de fibres élastiques. Les artérioles sont particulières car il n'y a plus d'adventice. On ne trouve plus que des cellules musculaires lisses et l'intima, cette dernière étant exclusivement formée de l'endothélium et de sa lame basale. Entre les artérioles et les veinules, il existe un réseau de capillaires uniquement formés d'un endothélium (et de sa lame basale).

Les échanges entre le sang et les organes passent par l'endothélium sur toute la longueur du système vasculaire mais sont particulièrement intenses au niveau de l'endothélium microvasculaire (artérioles pré-capillaires, capillaires et veinules post-capillaires). Par cette couche cellulaire, le sang échange des molécules et des cellules avec le tissu environnant.

La séparation entre le sang et les cellules épithéliales comprend trois couches concentriques se comportant comme une unité morpho-physiologique:

a) L'interface plasma-endothélium.

C'est une zone de transition entre le sang et les cellules endothéliales appelée glycocalyx qui recouvre toute la surface luminale sur une épaisseur de 100-200 nm (Squire *et al.*, 2001). Le glycocalyx est composé principalement de protéoglycanes qui sont des associations de protéines et de glycosaminoglycanes (héparane sulfate, chondroïtine sulfate), de glycoprotéines, de glycolipides et d'acide hyaluronique (Desjardins et Duling, 1990; Henry et Duling, 1999). De plus, de nombreuses molécules plasmatiques s'absorbent sur le glycocalyx (l' α 2-macroglobuline, le fibrinogène, l'héparine, l'albumine, la lipoprotéine lipase...). Cette couche immobile favorise l'arrêt des protéines et des cellules circulantes et facilite leur accès à la membrane endothéliale. Elle joue également un rôle dans la régulation de la perméabilité et dans la transduction des forces de cisaillement provoquées par le flux sanguin. Des cytokines, comme le facteur de nécrose des tumeurs (TNF- α) sont capables d'induire la sécrétion de protéase et de radicaux libres qui altèrent le glycocalyx favorisant ainsi la pénétration de macromolécules (Henry et Duling, 2000).

b) L'endothélium.

C'est une monocouche de cellules squameuses très aplaties connectées par des jonctions intercellulaires séparant le plasma et le liquide interstitiel. L'endothélium est un épithélium extrêmement perméable à l'eau et aux solutés qui est capable de moduler les échanges bidirectionnels. Les cellules endothéliales ont des propriétés différentes suivant leur organe d'origine (voir les revues de Garlanda et Dejana, 1997; Gebb et Stevens, 2004). Ils existent trois types d'endothélium caractérisés par leur morphologie : i) l'endothélium continu, présent surtout dans le cerveau et les poumons. ii) l'endothélium fenestré, qui se rencontre dans le rein, les intestins et les glandes endocrines, est caractérisé par l'existence de pores transendothéliaux mettant en communication directe le milieu intravasculaire avec le liquide interstitiel et iii) l'endothélium discontinu ou sinusöide possède de larges pores entre les cellules endothéliales qui permettent le passage de cellules sanguines au niveau de la moelle osseuse, du foie et de la rate.

c) La lame basale.

Les cellules endothéliales reposent sur la lame basale ou matrice extracellulaire. Elle consiste en un réseau hétérogène de protéoglycanes et de protéines (collagène de type IV et V, glycoprotéines, fibronectine, laminine, entactine) sécrétés par les cellules elles-mêmes. Ce réseau permet de renforcer l'endothélium. Dans les endothélia continus et fenestrés, la lame basale est continue alors que dans les endothélia discontinus, elle est elle-même discontinue voire absente.

2) Fonctions de l'endothélium.

L'endothélium intervient dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que l'homéostasie, la croissance, la tonicité vasculaire, l'hémostase, les processus d'inflammation et la perméabilité vasculaire (Sato, 2001; Galley et Webster, 2004).

Ainsi, les cellules endothéliales sécrètent des vasodilatateurs comme le monoxyde d'azote (NO) et des vasoconstricteurs tels que l'endothéline-1 qui contrôlent localement la tonicité des vaisseaux sanguins. Ces substances vont agir sur la réorganisation du cytosquelette des cellules musculaires lisses de la media sous jacentes aux cellules endothéliales. Les vasodilatateurs vont diminuer la tension au niveau de ces cellules et causer ainsi une dilatation des vaisseaux.

L'endothélium est la source primaire des molécules régulant l'hémostase et joue un rôle pivot dans le contrôle de l'hémostase et de la thrombose (voir la revue de Sagripanti et Carpi, 2000). L'hémostase est l'ensemble des processus qui concourent à l'arrêt des saignements. Lors d'un saignement, l'hémostase primaire se met en place avec une vasoconstriction des vaisseaux, l'adhésion des plaquettes sur les fibrines sous endothéliales et l'agrégation des plaquettes entre elles. Ensuite, la formation de la thrombine entraîne la coagulation. Enfin, le caillot formé est résorbé par fibrinolyse. Les cellules endothéliales sécrètent notamment, le facteur von Willebrand (vWF) qui initie l'hémostase primaire et permet une fixation forte entre le collagène et les plaquettes. Elles sécrètent également la fibronectine qui fixe la fibrine et la thrombospondine qui stabilise les agrégats plaquettaires. Ces trois molécules sont sécrétées du côté apical et basolatéral. Lorsque l'endothélium est endommagé, la thrombine active son récepteur à la surface des cellules endothéliales et déclenche, dans un premier temps, la formation de fibrine et l'agrégation plaquettaire. Cette activation augmente également la perméabilité intercellulaire, la sécrétion de vWF, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ et la synthèse de NO. Après un délai, il y a sécrétion de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1), d'interleukine-1 (IL-1) et de l'inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène (PAI-1). Les cellules endothéliales sont les principales sécrétrices de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) qui convertit le plasminogène en plasmine favorisant ainsi l'activité

fibrinolytique. Cette activité fibrinolytique est déterminée par la balance entre le t-PA et son inhibiteur, le PAI-1. Dans des conditions normales, il y a peu de PAI-1 à la surface des cellules endothéliales. Les médiateurs de l'inflammation tels que les endotoxines, TGF- β , IL-1 et TNF- α induisent une activité prothrombotique (Grignani et Maiolo, 2000).

Au niveau d'un site inflammatoire, les cytokines pro-inflammatoires stimulent l'expression des molécules d'adhésion cellulaire (CAM) à la surface des cellules endothéliales. Les cellules immunitaires se fixent à l'endothélium activé et peuvent atteindre le site d'inflammation.

La croissance vasculaire se produit au cours de deux phénomènes : la vasculogénèse et l'angiogénèse. La vasculogénèse est le processus initial de construction du système vasculaire au cours du développement. Il fait intervenir les hemangioblastes ou les angioblastes qui sont les cellules souches des cellules endothéliales. L'angiogénèse conduit à la formation d'un nouveau vaisseau à partir de vaisseaux pré-existants. Les cellules endothéliales sont généralement quiescentes. L'angiogénèse est donc un phénomène consécutif à une pathologie.

Dans ce chapitre, nous nous arrêterons sur la fonction qui va déterminer le succès d'un transfert de gène par voie systémique, la perméabilité vasculaire.

3) La perméabilité vasculaire.

Les cellules endothéliales adhèrent entre elles et à la matrice extracellulaire pour former un endothélium structuré assurant le contrôle et la régulation de la perméabilité vasculaire. Il existe trois types de jonctions entre les cellules endothéliales (Figure 11).

Les **jonctions communicantes** (gap junctions) mettent en relation le cytoplasme de deux cellules adjacentes. Elles jouent un rôle important dans la communication cellulaire mais n'interviennent pas dans la structuration de la barrière endothéliale.

Les **jonctions serrées** sont les jonctions les plus apicales et forment des contacts rapprochés entre les cellules (Matter et Balda, 2003). Elles constituent une barrière pour le passage de molécules du lumen vers le tissu sous jacent et pour la diffusion des lipides et protéines entre les domaines apical et basolatéral. Trois types de protéines transmembranaires participent à la formation de ces jonctions : l'occludine, la claudine et la molécule d'adhésion jonctionnelle (JAM) (voir les revues de Vorbrodt et Dobrogowska, 2003). Chaque couple de ces protéines provenant de deux cellules adjacentes est relié au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des protéines ZO (Zonula Occludens). Ce type de jonction forme l'élément essentiel de la barrière endothéliale entre le sang et le cerveau. Dans les poumons, les jonctions serrées sont moins denses.

Les **jonctions adhérentes** apparaissent comme la principale structure régulant la perméabilité macromoléculaire dans l'endothélium. Elles sont principalement formées par les cadhérines reliées au microfilaments d'actine par des protéines cytoplasmiques telles que les caténines (voir la revue de Vorbrodt et Dobrogowska, 2003). L'endothélium exprime une cadhérine spécifique, la VE-cadhérine (Ali *et al.*, 1997). Les cadhérines interagissent avec le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des caténines intracellulaires (α -, β - et γ -caténine). Les cadhérines ont dans leur domaine extracellulaire un motif qui lie le calcium. La fixation du calcium sur les cadhérines participe à l'augmentation de la perméabilité.

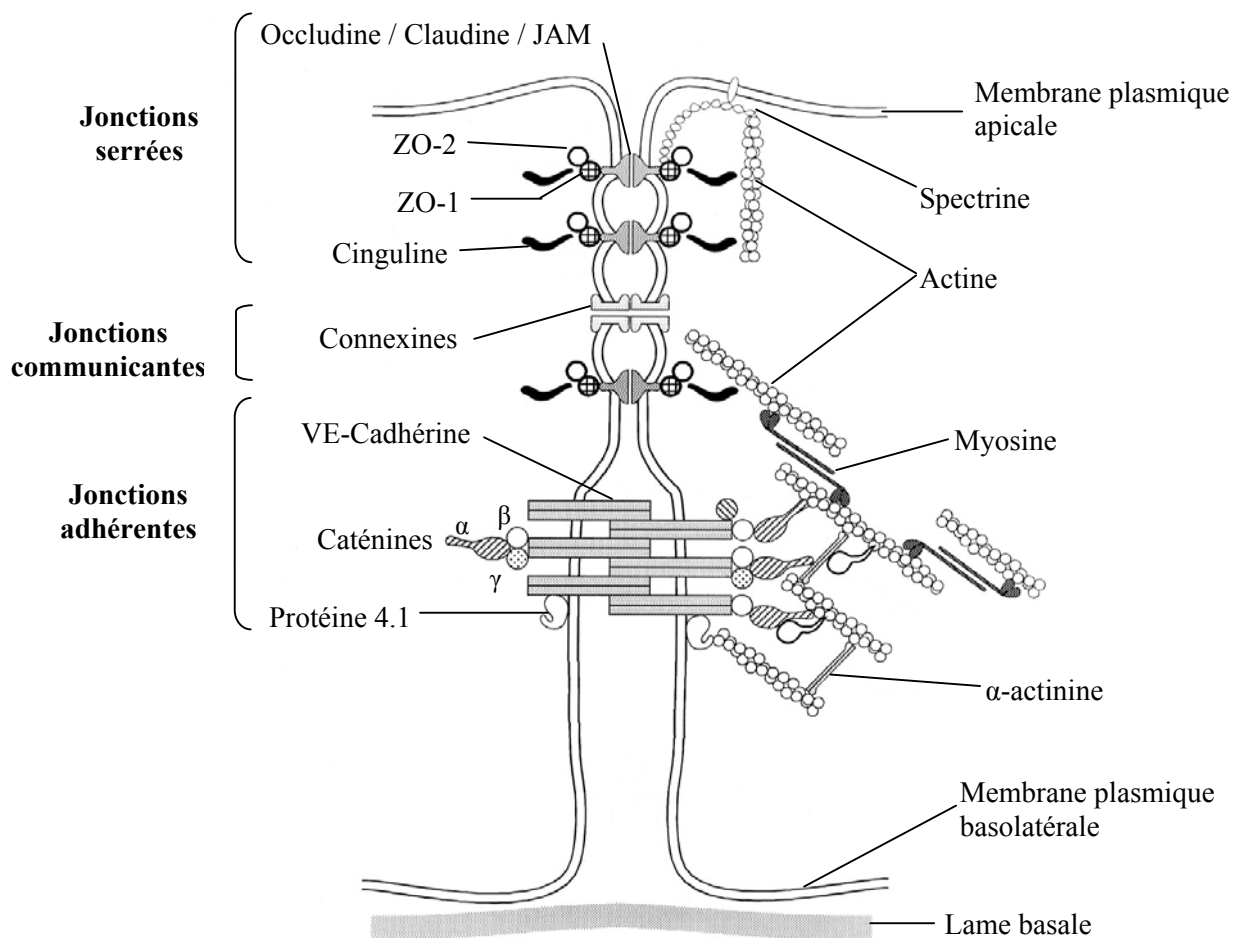


Figure 11: Structure des jonctions intercellulaires. D'après Michel et Curry, 1999.

L'intégrité des jonctions serrées et adhérentes est régulée par de nombreux facteurs de nature très différente tels que des cytokines et des facteurs de croissance mais également par les forces de cisaillement provoquées par le flux sanguin. Les facteurs favorisant l'augmentation de la perméabilité vasculaire seront développés dans la partie III[C].

Les cellules endothéliales peuvent avoir un phénotype très différent suivant l'organe ou le type de vaisseaux sanguins dont elles sont issues (Ribatti *et al.*, 2002; Gebb et Stevens, 2004). Il existe également, au sein d'un même organe, des différences phénotypiques qui dépendent de la taille des vaisseaux et de leur fonction (King *et al.*, 2004). De nombreuses fonctions des cellules endothéliales sont donc ainsi régulées différemment dans des cellules endothéliales micro- ou macro-vasculaires. Plus particulièrement dans leur fonction de barrière, les cellules endothéliales ont des réponses phénotypiquement différentes aux stimuli régulant la perméabilité (Kelly *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1998). Au niveau du poumon, la diffusion des macromolécules est plus élevée dans les vénules que dans les artérioles (Qiao et Bhattacharya, 1991). A un niveau structural plus fin, l'endothélium microvasculaire forme une barrière plus étanche que les artérioles et les vénules (Parker et Yoshikawa, 2002). Ces dernières sont, en effet, moins sensibles à l'action du calcium sur les jonctions adhérentes. Les médiateurs de l'inflammation activent l'entrée du calcium dans les cellules endothéliales microvasculaires sans conséquence sur la concentration d'AMPc (Kelly *et al.*, 1998). Dans les

cellules macrovasculaires, cette augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est suffisante pour diminuer la concentration d'AMPC et augmenter la perméabilité. De même, la production de NO après une stimulation par le TNF- α ou l'INF- γ est élevée dans les cellules endothéliales macrovasculaires de l'aorte pulmonaire, intermédiaire dans l'artère et faible dans les cellules des microvaisseaux (Geiger *et al.*, 1997). La régulation de la perméabilité des microvaisseaux semble donc être plus complexe que celle des gros vaisseaux.

4) Spécificité de l'endothélium pulmonaire.

Il existe, au niveau des poumons, une double circulation sanguine : le système circulatoire nutritif pulmonaire assure l'oxygénation et l'apport nutritif des poumons. Cette circulation est assurée par les vaisseaux bronchiques. Les artères bronchiques naissent de l'aorte et suivent le trajet des bronches jusqu'aux bronches terminales. Arrivées au bout, ces artères donnent naissance aux capillaires bronchiques puis suivent les veines bronchiques, les veines azygos et enfin la veine cave supérieure qui ramène le sang vers coeur. Le système circulatoire fonctionnel va, quant à lui, assurer l'oxygénation de tout l'organisme (Figure 12). Il se fait par l'artère pulmonaire qui pénètre dans les poumons au niveau du hile et se ramifie jusqu'aux capillaires pulmonaires qui vont être en contact direct avec les alvéoles. L'artère pulmonaire conduit le sang non oxygéné dans les alvéoles où les échanges gazeux ont lieu. Les veines pulmonaires ramènent le sang oxygéné jusqu'au cœur gauche.

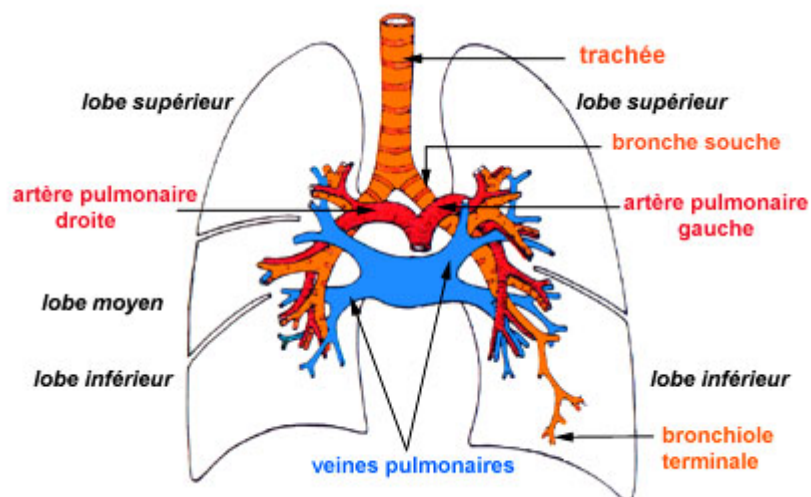


Figure 12: Schéma représentant la circulation sanguine fonctionnelle assurant l'oxygénation de l'organisme.

L'épithélium trachéo-bronchique comporte des glandes bronchiques, des cellules à mucus et des cellules ciliées qui sont chargées d'évacuer ce mucus vers la trachée et le pharynx. Dans les bronchioles, l'épithélium devient progressivement non cilié et les glandes disparaissent. Au niveau des alvéoles pulmonaires, le revêtement épithélial est formé d'une couche unicellulaire constituée de pneumocytes de type I (93% de la surface alvéolaire) et de pneumocytes de type II reposant sur une lame basale. Ces derniers ont pour fonction de synthétiser des molécules entrant dans la composition du surfactant alvéolaire qui participe à la structuration du mucus en remontant dans les bronches. La paroi des capillaires alvéolaires est constituée d'un endothélium continu, très mince reposant sur une lame basale qui fusionne souvent avec celle de l'épithélium.

Au niveau des poumons, l'endothélium doit assurer l'oxygénation du sang tout en protégeant l'organisme contre une entrée de pathogènes. Ainsi l'étanchéité de l'endothélium

joue un rôle primordial *via* une régulation stricte de la perméabilité. Après une injection systémique, cette perméabilité devient l'étape limitante pour le passage de molécules thérapeutiques dans les cellules épithéliales pulmonaires.

B| Les différentes voies d'endocytose.

Comme il a été mentionné précédemment, pour exercer leur rôle de barrière sélective des macromolécules plasmatiques, les cellules endothéliales sont métaboliquement très actives et possèdent différentes voies d'internalisation qui assurent la perméabilité sélective de l'endothélium. Pour communiquer avec le milieu extracellulaire, les cellules endothéliales, comme toutes les cellules eucaryotes, utilisent des voies de sécrétions et d'internalisation organisées en compartiments intracellulaires distincts connectés par un trafic vésiculaire (Figure 13).

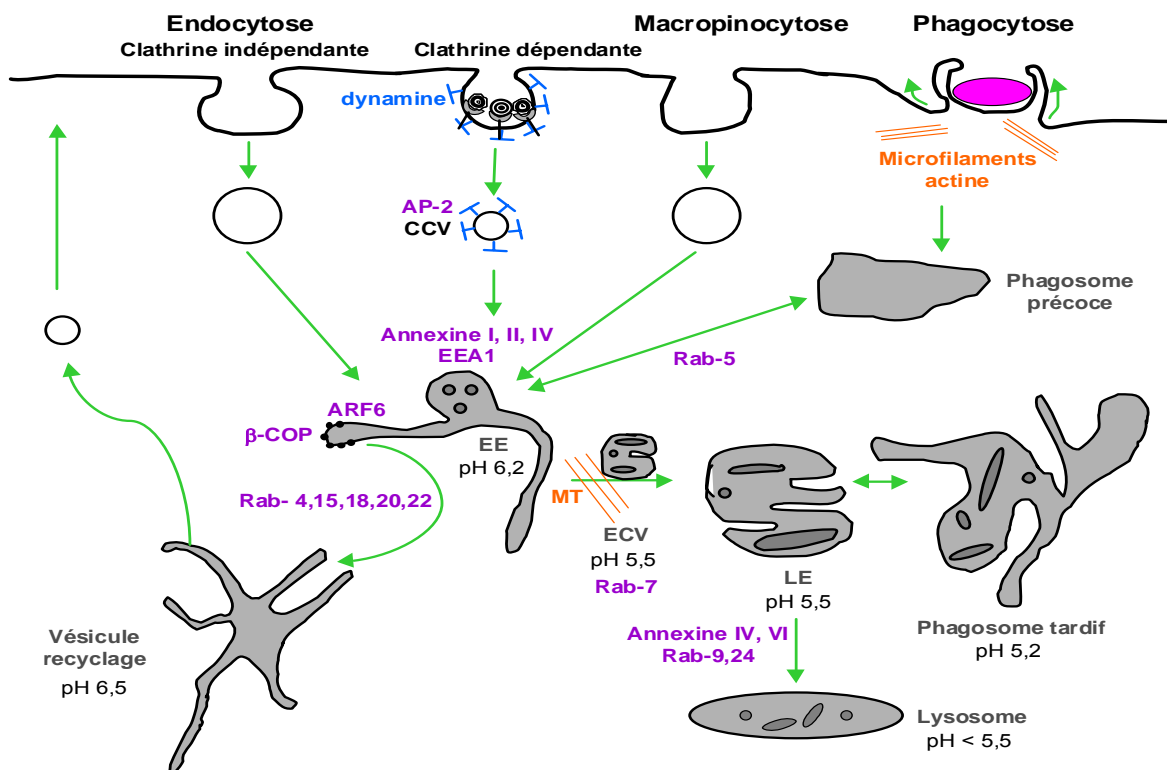


Figure 13: Schéma général des voies de l'endocytose.

Les abréviations correspondent respectivement à EE: endosome précoce (Early Endosome), LE: endosome tardif (Late Endosome), CCV: vésicule à clathrine (Clathrin-Coated Vesicle), ECV: vésicule de transport (Endosome Carrier Vesicle), TGN: réseau *trans*-Golgien (*trans*-Golgi Network), RER: réticulum endoplasmique rugueux (Rough Endoplasmic Reticulum), ERGIC: compartiment intermédiaire du RER (Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment), MT: microtubules. Les abréviations de certains marqueurs de compartiments vésiculaires (en violet) sont AP: protéine adaptatrice (Adaptin Protein), EEA1: antigène 1 des endosomes précoces (Early Endosome Antigen 1), ARF: facteur d'ADP-ribosylation (ADP-Ribosylation Factor), COP: protéine de manteau (Coat Protein). La voie de transcytose n'est pas représentée dans ce schéma pour des raisons de clarté.

Des mécanismes de régulation précis permettent de maintenir une composition constante en protéines et en lipides de ces compartiments et d'assurer le tri des protéines solubles ou membranaires. Ainsi, l'endocytose contribue largement à la nutrition cellulaire, à la constitution de réserves, mais aussi à l'épuration de l'organisme. Selon la taille et la nature des produits ingérés, ce phénomène s'appelle endocytose ou phagocytose.

L'endocytose est certainement le mécanisme d'internalisation le mieux étudié à ce jour et en particulier celui qui utilise des vésicules recouvertes de clathrine. Cependant, il existe également des voies d'internalisation indépendantes de la clathrine (Nichols et Lippincott-Schwartz, 2001).

1) L'endocytose dépendante de la clathrine.

L'endocytose dépendante de la clathrine est liée à l'internalisation de molécules qui sont reconnues à la surface de la membrane plasmique par des récepteurs spécifiques (voir la revue de Mousavi *et al.*, 2004). Le système d'endocytose comportant les vésicules mantelées de clathrine, les endosomes et les lysosomes est présent dans tous les endothélia mais ces organites ne sont pas abondants.

Le processus général de formation des vésicules d'endocytose débute après la liaison d'un ligand avec son récepteur membranaire spécifique. Les complexes ligand/récepteur sont alors internalisés par la formation de puits dits "mantelés". Ces dépressions sont recouvertes sur la face interne par un réseau de clathrine. La clathrine s'organise en structures trimériques, ou "triskelions", qui sont à la base de l'organisation du "filet" soutenant la membrane. Au cours de ce processus, les adaptines (AP2) viennent se fixer sur certaines séquences peptidiques du domaine cytosolique des récepteurs membranaires. Cette fixation va permettre la mobilisation de la clathrine vers la membrane plasmique. Ce processus se termine par la formation d'une vésicule mantelée d'un diamètre d'environ 100 nm et libre dans le cytoplasme. La fermeture et le détachement de la vésicule de la membrane plasmique sont induits par la phosphorylation de la dynamine. La vésiculation s'accompagne dès lors de l'activation d'une V-ATPase à proton responsable de l'acidification de la lumière de la vésicule. Cette acidification induit la perte du manteau de clathrine. On assiste ainsi à la formation de vésicules lisses hautement fusio-gènes qui vont former les premiers endosomes dits "précoces".

L'endocytose conduit les molécules internalisées dans différents compartiments vésiculaires dont la formation reste sujette à deux grandes hypothèses. En effet, deux modèles ont été proposés ; celui du trafic vésiculaire (Griffiths et Gruenberg, 1991) et celui de la maturation (Murphy, 1991).

Dans le modèle du trafic vésiculaire, les endosomes forment des organelles stables et permanentes dans les cellules. La formation des endosomes précoces a lieu par la fusion de vésicules d'endocytose ayant perdu leur manteau de clathrine. A partir de ces endosomes précoces, des événements de fission vont permettre la formation de vésicules de recyclage et de vésicules de transport destinées à délivrer leur contenu dans les endosomes tardifs préexistants. Lors de la formation de ces vésicules, les endosomes précoces ne s'épuisent pas et restent des compartiments stables dans les cellules contrairement au modèle de maturation.

Dans le modèle de maturation, les endosomes précoces sont formés *de novo* par un nombre limité de fusions de vésicules d'endocytose provenant de la membrane plasmique et ceci pendant un intervalle de temps limité. Ces endosomes précoces vont ensuite s'épuiser par des processus de fission en formant des vésicules de recyclage et la dernière vésicule restante forme ainsi l'endosome tardif.

Les travaux de Griffiths et Gruenberg (1991) proposent un modèle particulier dans le cas des cellules polarisées. Ils suggèrent l'existence d'endosomes précoces, apicaux et baso-latéraux. De même, il est supposé deux types de vésicules de transport apicales et baso-latérales. Ces deux types d'endosomes précoces sont topologiquement et fonctionnellement

distincts et conservent leurs propriétés et leur identité biochimique au cours du trafic vésiculaire (Parton *et al.*, 1989). Les endosomes précoces apicaux et baso-latéraux ne fusionnent pas entre eux *in vitro* mais leur contenu se rejoint dans les endosomes tardifs (Parton *et al.*, 1989). Dans le cas d'un modèle de maturation dans les cellules polarisées, il faudrait donc supposer l'existence de deux processus de maturation différents des endosomes précoces.

Les endosomes précoces représentent à la fois le seul point d'entrée pour les molécules internalisées *via* une endocytose dépendante de la clathrine et le compartiment où va s'effectuer leur tri selon leur destination. En effet, le devenir des ligands et des récepteurs internalisés est variable. Un des membres du couple ou les deux peuvent être dirigés vers les endosomes de recyclage ou le système vésiculaire de dégradation.

Après avoir quitté les endosomes précoces, les molécules recyclées se localisent dans des structures tubulaires distinctes de diamètre 50 nm environ correspondant à des endosomes de recyclage. Ces tubules forment un réseau dynamique ne présentant pas de connexion détectable avec les endosomes précoces et se localisent dans des régions différentes dans la cellule (Hopkins *et al.*, 1990). Les endosomes de recyclage sont moins acides (pH ~ 6,5) que les endosomes précoces (Gagescu *et al.*, 2000). Cependant, il n'a pas été mis en évidence de différences au niveau des protéines membranaires entre ces endosomes.

Les propriétés de fusion des endosomes ont été étudiées *in vitro* (Gruenberg *et al.*, 1989; Aniento *et al.*, 1993) et mettent en évidence que la fusion directe entre les endosomes précoces et tardifs n'a pas lieu. Ainsi, dans la voie de dégradation, des vésicules intermédiaires dénommées ECV/MVBs assurent le transport des molécules internalisées entre les endosomes précoces et les endosomes tardifs. Ces vésicules sont de grande taille (300-400 nm de diamètre) et ne contiennent pas de protéines spécifiques des endosomes précoces, ni de récepteurs destinés au recyclage, ni l'essentiel des lipides et des protéines constituant les membranes des endosomes tardifs. Une fois formés, les ECV/MVBs migrent vers les endosomes tardifs le long des microtubules en acquérant des capacités de reconnaissance et de fusion sélectives avec ces endosomes (voir les revues de Chen et Scheller, 2001 et Stein *et al.*, 2003).

Tout comme les endosomes précoces, les endosomes tardifs sont très dynamiques et possèdent des activités de fusion homotypique *in vitro* (Aniento *et al.*, 1993). Ils ont une organisation très complexe et pléiomorphe avec des régions en forme de tubule et des vésicules contenant de nombreuses invaginations membranaires (Griffiths *et al.*, 1988). Les endosomes tardifs tout comme les lysosomes contiennent des hydrolases, leur pH interne est très acide (pH ~ 5,5) et leur membrane externe est composée principalement des mêmes glycoprotéines. Jusqu'à présent, aucun lipide ou aucune protéine n'a été identifié comme appartenant uniquement aux lysosomes et pas aux endosomes tardifs. De même, la machinerie de reconnaissance/fusion semble se partager entre ces deux compartiments (Caplan *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2003). Les endosomes tardifs et les lysosomes peuvent échanger rapidement leur contenu et leurs protéines membranaires et interagissent probablement de façon dynamique en formant un hybride intermédiaire (Mullock *et al.*, 1998). Les endosomes tardifs et les lysosomes diffèrent des endosomes précoces non seulement par leur localisation subcellulaire, leurs propriétés physiques et leur acidité mais aussi au niveau de leur contenu et de leur distribution en protéines spécifiques telles que les petites GTPases de la famille des Rab (Gruenberg et Maxfield, 1995).

2) L'endocytose indépendante de la clathrine.

Plusieurs mécanismes indépendants de la clathrine ont été identifiés incluant l'internalisation *via* les cavéoles et réseaux lipidiques (lipids rafts), la macropinocytose, l'endocytose indépendante des récepteurs et la phagocytose. De plus, certaines molécules peuvent être internalisées à la fois par une endocytose dépendante de la clathrine et par une endocytose indépendante de la clathrine.

2.1) La pinocytose en phase liquide.

Il s'agit d'un processus, constitutif, non spécifique, d'absorption des fluides et solutés qui est en relation avec l'activité normale de remplacement de la membrane plasmique. Les cellules endothéliales comme toutes les cellules eucaryotes ingèrent en effet continuellement sous forme de vésicules des morceaux de leur membrane plasmique par un phénomène de type pinocytaire. Les vésicules formées par invagination de la membrane plasmique internalisent ainsi des substances en solution dans le milieu extracellulaire. La vitesse de ce processus peut être relativement élevée. On estime qu'un macrophage remplace l'ensemble de sa membrane plasmique toutes les 30 minutes (Morre *et al.*, 1984).

2.2) La potocytose et cavéoles.

La potocytose se réfère à un mécanisme impliquant la formation de cavéoles au niveau de la membrane plasmique (voir la revue de Kurzchalia et Parton, 1999). Les cavéoles sont présentes dans de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les cardiomyocytes, les adipocytes, les pneumocytes de type I, les cellules endothéliales et épithéliales. Elles sont très abondantes dans les cellules endothéliales puisqu'elles représentent environ 95% de la surface vésiculaire totale et 15% du volume total (Predescu et Palade, 1993).

Ces structures sont composées de protéines comme la cavéoline et la dynamine et sont riches en lipides (cholesterol, glycosphingolipides et sphingomyéline). Ce sont des invaginations de 50 à 100 nm de diamètre dont la structure s'explique par la polymérisation de la cavéoline. Cette protéine possède un domaine N-terminal, un domaine membranaire et un domaine C-terminal. Le domaine N-terminal contient une séquence (résidues 82-101) appelée CSD (caveolin scaffolding domain) qui permet l'oligomérisation de la protéine. Les monomères de cavéolines s'assemblent en homo-oligomère de 14-16 monomères. Ces homo-oligomères interagissent entre eux par le domaine C-terminal de leur monomères. Les cavéolines sont fichées dans la membrane plasmique grâce à leur domaine transmembranaire et les domaines N- et C-terminal sont intra-cytoplasmiques. De plus, le domaine C-terminal possède trois brins palmitoyls qui sont fixés dans la membrane plasmique. Les cavéoles de la membrane plasmique sont ancrées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'une protéine, la filamine dont le domaine C-terminal se lie au domaine N-terminal des cavéolines.

Les cavéoles contiennent également de la dynamine, une GTPase située au bord de l'invagination cavéolaire qui permet la fermeture de la vésicule et la fission de la cavéole (Oh *et al.*, 1998).

Les cavéoles sont à la base d'une voie particulière d'internalisation pour différentes molécules comme le folate, des protéines de signalisation ancrées par le GPI, l'albumine, l'IL2 et le facteur autocrine de motilité (AMF) (Nichols et Lippincott-Schwartz, 2001). C'est par elles que pénètrent aussi certaines toxines (toxine tétanique et la toxine du cholera) et certains virus comme le virus SV40 (Pelkmans *et al.*, 2001) avant de s'accumuler dans des cavéosomes qui sont des vésicules ne contenant pas les traceurs de l'endocytose dépendante de la clathrine.

Les domaines N-terminaux de différentes protéines actives dans le recrutement de la cavéoline telles que les récepteurs et transporteurs de folate, la pompe à calcium, la eNOS

(endothelial Nitric Oxide Synthase) et le TNFR (récepteur du TNF, facteur de nécrose des tumeurs), permettraient de concentrer la cavéoline au niveau des microdomaines membranaires, appelés « lipids rafts », où se trouvent ses molécules. Après une association des récepteurs avec leur ligand, la concentration des molécules à internaliser au niveau de structures réceptrices situées dans les « lipids rafts », permettrait la formation des vésicules cavéolaires.

Comme dans les endosomes, l'acidification de la lumière des cavéoles par une V-ATPase à proton engendrerait la libération des ligands des récepteurs (Mineo et Anderson, 1996). Certaines molécules internalisées pourraient alors être transportées activement à travers la membrane cavéolaire par des transporteurs spécifiques (comme on l'envisage pour l'acide folique) ou encore être libérées dans le milieu intracellulaire par ouverture de la cavéole. L'internalisation *via* les cavéoles peut être inhibée par la filipine, la cytochalasine D et les esters de phorbols (Schnitzer *et al.*, 1994).

Les cavéoles jouent donc un rôle important dans le transport transmembranaire de différents éléments mais également dans différents mécanismes de signalisation transmembranaire, de différenciation cellulaire ou encore d'initiation de l'apoptose. Le rôle des cavéoles paraît donc assez large. Il reste toutefois loin d'être éclairci et fait à l'heure actuelle l'objet de nombreuses études.

2.3) La macropinocytose.

La macropinocytose est une voie d'internalisation qui fait intervenir une déformation de la membrane plasmique entraînant la formation de larges vésicules dénommées macropinosomes. Ce mécanisme est particulièrement bien développé dans les cellules dendritiques et les macrophages. Les macropinosomes sont des vésicules hétérogènes de grande taille (entre 0,5 et 5 μm). Ces grosses vésicules prennent le plus souvent naissance au niveau de la région marginale de la cellule riche en actine corticale polymérisée, qui est à l'origine d'ondulations membranaires ou « ruffling », produisant des feuilletts amincis projetés vers l'extérieur de la cellule (Swanson et Watts, 1995). Ces feuilletts se prolongent puis se referment contre la membrane plasmique, générant ainsi des macropinosomes.

La macropinocytose est une voie constitutive dans les cellules transformées (Amyere *et al.*, 2000) et dans les cellules dendritiques immatures (Sallusto *et al.*, 1995). Cependant, dans les autres types cellulaires où cette voie se rencontre, elle est régulée et stimulée notamment par le facteur de croissance EGF, les esters de phorbol (agents promoteurs de tumeurs ; Swanson, 1989) et par Ras (Bar-Sagi et Feramisco, 1986).

L'endocytose du fluide extracellulaire par la macropinocytose se rapproche de la pinocytose en phase liquide. La différence entre ces deux types de pinocytoses tient essentiellement à la taille des vésicules. A certains égards, la macropinocytose ressemble à la phagocytose notamment en considérant le rôle important que joue le cytosquelette dans la déformation de la membrane plasmique et la formation des vésicules (Swanson et Baer, 1995). De plus, les macropinosomes ressemblent à des « phagosomes vides » c'est-à-dire sans particules à l'intérieur. Cependant, la macropinocytose et la phagocytose sont régulées différemment.

Le comportement des macropinosomes diffère selon les types cellulaires. Dans les macrophages, ils se déplacent vers le centre de la cellule, s'acidifient et fusionnent avec les lysosomes (Racoosin et Swanson, 1993). Dans les cellules épidermoïdes de carcinome humain A431 stimulées avec de l'EGF, ils interagissent peu avec les autres compartiments intracellulaires et sont majoritairement recyclés à la surface (Hewlett *et al.*, 1994). Les cytochalasines, qui déstructurent le cytosquelette d'actine, et l'amiloride, inhibiteur du canal Na^+/H^+ , sont des inhibiteurs de la macropinocytose.

Dans les cellules endothéliales, les molécules de surface ICAM-1 et PECAM-1 semblent être internalisées par la voie macropinocytaire (Muro *et al.*, 2003). Toutefois, la macropinocytose ne semble pas être une voie d'internalisation importante dans ces cellules.

2.4) La phagocytose.

La phagocytose apparaît comme une forme particulière d'endocytose réservée à l'internalisation de particules de grande taille (débris cellulaires, bactéries, cellules âgées, infectées ou étrangères) et nécessite la polymérisation du cytosquelette d'actine. Elle fait intervenir les mêmes mécanismes d'internalisation, d'acidification du contenu vésiculaire et de liaison aux lysosomes que l'endocytose clathrine dépendante. Les vésicules formées ou phagosomes ne possèdent cependant pas de manteau de clathrine. La maturation des phagosomes a lieu par une succession de fusions avec les endosomes et les lysosomes et nécessite aussi l'association avec le cytosquelette d'actine et les microtubules (Allen et Aderem, 1996). Ce mode d'internalisation concerne très souvent des cellules professionnelles phagocytaires en particulier les macrophages et les cellules dendritiques mais il existe aussi chez des cellules non professionnelles telles que des cellules endothéliales (HUVEC) et les cellules épithéliales pulmonaires (Wasylnka et Moore, 2002). En cela, la phagocytose apparaît selon les cas comme un mécanisme de nettoyage ou de défense de l'organisme. Par ce mécanisme, les lymphocytes, les monocytes et les polynucléaires se chargent de l'élimination des structures infectieuses, abîmées ou sénescents.

Les travaux de Dini et collaborateurs (2002) montrent que les hépatocytes, les cellules de Kupffer, et les cellules endothéliales du foie sont capables de reconnaître et de phagocyter des cellules apoptotiques *via* des récepteurs spécifiques (galactose, mannose, phosphatidylsérine). Plusieurs types de récepteurs cellulaires peuvent conduire à la phagocytose. Ryan et collaborateurs (1989) ont mis en évidence des cellules endothéliales de l'artère principale pulmonaire capables de phagocyter la bactérie *Salmonella minnesota*. Le mutant Re de cette bactérie fixe l'élément plasmatique C1q du Complément (le premier composant de la voie d'activation classique du Complément) et il est reconnu par le récepteur de C1q à la surface des cellules endothéliales. De manière générale, la phagocytose est une voie d'internalisation que l'on trouve dans les cellules endothéliales localisées au niveau des zones distales des orifices des branches aortiques (Emura *et al.*, 1992).

La phagocytose apparaît donc comme un mode d'internalisation tout aussi complexe que l'endocytose qui pourrait intervenir dans l'internalisation des polyplexes pour le transfert de gènes dans les cellules. Cependant, cette voie est, comme la macropinocytose, peu développée dans les cellules endothéliales.

3) Les voies d'endocytose empruntées par les polyplexes à base de PEI ou de pLK.

Afin de comprendre et d'améliorer les systèmes non viraux de transfert de gènes, différents groupes ont recherché leur voie d'endocytose et étudié leur trafic intracellulaire. La majorité de ces travaux ont été entrepris sur des cellules non polarisées. L'identification des voies d'internalisation peut être faite en exploitant différents agents et conditions d'incubation (Tableau 11).

Des travaux concernant surtout des polyplexes formés avec de la PEI ou de la pLK substituée ou non par des ligands spécifiques ont été réalisés. En effet, il a été montré que la PEI et la pLK substituées avec des résidus osidiques transfectaient des cellules épithéliales primaires des voies aériennes humaines et des cellules des glandes séreuses (CF-KM4) plus efficacement que les vecteurs non substitués (Kollen *et al.*, 1996; Fajac *et al.*, 1999; Allo *et al.*, 2000; Fajac *et al.*, 2003). La PEI et la pLK lactosylées sont internalisées *via* des lectines membranaires à la surface des cellules épithéliales primaires des voies aériennes et les cellules

ΣCFTE29o- majoritairement par une endocytose dépendante de la clathrine (Grosse *et al.*, 2004). Lorsque la voie cavéolaire est inhibée par la filipine ou la nystatine, l'internalisation est faiblement diminuée et l'inhibition de la macropinocytose ne modifie pas l'endocytose des polyplexes. Les polyplexes pLK mannosylés ou lactosylés sont de la même manière endocytés par la voie dépendante de la clathrine (Grosse *et al.*, 2002; Klink *et al.*, 2003). Si les polyplexes pLK et PEI glycosylés ayant une taille comprise entre 100 et 200 nm sont endocytés par la voie dépendante de la clathrine, les polyplexes de taille supérieure à 200 nm seraient internalisés par macropinocytose (Grosse *et al.*, 2005). Enfin, les polyplexes PEI glycosylés de taille inférieure à 100 nm sont internalisés par les cavéoles et acheminés dans le RE.

Au laboratoire, le routage intracellulaire de polyplexes pLK-His a été étudié dans les cellules épithéliales des voies aériennes (ΣCFTE29o-) et les cellules d'hépatocarcinome humain (HepG2). En utilisant la cytométrie en flux et la microscopie confocale, il a été observé que ces polyplexes pénètrent dans ces cellules en empruntant deux voies : la voie dépendante de la clathrine et la macropinocytose. Des mesures de pH des vésicules contenant les polyplexes ont permis de mettre en évidence que l'ADN se trouve dans des vésicules faiblement acides (pH~7) alors que la pLK-His se trouve dans un environnement acide (pH<6) (Goncalves *et al.*, 2002; Goncalves *et al.*, 2004). Il y aurait également un recyclage de l'ADN vers la surface des cellules HepG2.

Il a été montré que des polyplexes formés avec la pLK et la PEI se fixent sur les protéoglycanes du glycocalyx de cellules épithéliales (HeLa : cellules épithéliales humaines et CHO-K1 : cellules d'ovaires de hamsters chinois) et suivent le trafic des protéoglycanes notamment une endocytose dépendante de la clathrine (Mislick et Baldeschwieler, 1996; Kopatz *et al.*, 2004).

Différentes équipes ont montré la capacité des polyplexes à transfecter des cellules polarisées en culture. Les PEI de 22 kDa et de 25 kDa ont été utilisées sur des cellules épithéliales mammaires d'ovins (OMEC II), sur des cellules de carcinomes humains (CaCo-2) (Duchler *et al.*, 2001) ou des cellules épithéliales bronchiques humaines (16HBE) (Wiseman *et al.*, 2003). La PEI transfecte plus efficacement des cellules épithéliales des pigments rétinien (RPE) lorsqu'elle est internalisée du côté apical des cellules (Mannermaa *et al.*, 2005). Dans ces études, les voies d'internalisation n'ont pas été recherchées. D'autres études ont été réalisées avec des polyplexes munis de molécules ligands pour cibler des récepteurs de surface. Dans des 16HBE, des polylysines-RGD utilisées avec des liposomes cationiques permettent de cibler les intégrines αv (Scott *et al.*, 2001). Ces complexes seraient internalisés par la voie dépendante de la clathrine, suivant ainsi la voie d'endocytose des intégrines.

Cependant, il n'existe pas d'études disponibles détaillant les mécanismes d'internalisation des polyplexes PEI, pLK ou pLK-His dans des cellules polarisées et en particulier des cellules endothéliales polarisées.

Tableau 11: Exemples d'effet de drogues et de la température sur les différentes voies d'internalisation.

	Traitement	Effets
Endocytose dépendante de la clathrine	Incubation à 18°C	Inhibition : blocage du trafic des ECV/MVBs et du recyclage.
	Acidification du cytosol	Inhibition : assemblage du manteau de clathrine aberrant.
	Déplétion des pompes à K ⁺ et Hypertonie	Inhibition : dissociation de la clathrine et accumulation des triskelions.
	Chlorpromazine	Inhibition : dissociation de la clathrine et des AP-2 au niveau de la membrane plasmique.
	Wortmanine	Inhibition : inhibition de la PI3K et de la formation des ECV/MVBs.
	Nocodazole	Inhibition : dépolarisation des microtubules.
Cavéoles	Filipine, Nystatine, Amphotéricine	Inhibition : séquestration du cholestérol, dissociation des protéines au niveau des Rafts.
	Cytochalasine D	Inhibition : rupture des microfilaments d'actine.
	Esters de phorbol	Inhibition : activation de protéines Kinase C.
	Acide okadaïque	Stimulation : inhibition générale des phosphatases.
Macropinocytose	EGF/esters de phorbol	Stimulation : effet associé au bourgeonnement de la membrane-kinase dépendante.
	Amiloride	Inhibition : inhibition de l'échangeur Na/H ⁺ et de la tyrosine kinase du récepteur EGF.
Phagocytose	Cytochalasine D	Inhibition : rupture des microfilaments d'actine.
Transcytose	Incubation à 16°C	Inhibition

D'après Lamaze et Schmid, 1995.

C| Les différentes voies de passage transendothélial.

L'endothélium est perméable aux solutés, macromolécules et leucocytes. Cependant, cette perméabilité dépend de l'organe et des caractéristiques morphologiques de l'endothélium. On peut distinguer une voie inter- ou para- cellulaire et des voies intracellulaires comme la transcytose et les fenestreae (voir la revue de Michel et Curry, 1999).

1) La voie intercellulaire ou paracellulaire.

La perméabilité intercellulaire de l'endothélium s'effectue au niveau des jonctions entre les cellules endothéliales. Les jonctions intercellulaires sont formées des jonctions serrées et des jonctions adhérentes. On trouve au niveau de ces jonctions des pores de quelques nanomètres de diamètre qui permettent le transport diffus de solutés. La rupture ou la fragilisation de ces jonctions peut ouvrir des fentes dans l'endothélium (voir la revue de Lum et Malik, 1996). La régulation de ce transport paracellulaire est associée à la modulation du réseau d'actine lié indirectement aux protéines formant les jonctions et donc à la membrane plasmique (Dudek et Garcia, 2001).

Les jonctions serrées et adhérentes sont régulées par un grand nombre de facteurs de croissance, de cytokines, de drogues et d'hormones (voir la revue de Harhaj et Antonetti, 2004). Par exemple, l'hydrocortisone, la prolactine et les acides gras insaturés favorisent la formation des jonctions serrées en augmentant l'expression de l'occludine (Jiang *et al.*, 1998; Stelwagen *et al.*, 1999; Antonetti *et al.*, 2002). Au contraire, les cytokines et les facteurs de croissance tels que le TNF- α (Blum *et al.*, 1997), IL-1 β (Bolton *et al.*, 1998) ainsi que le VEGF (Wang *et al.*, 2001) et l'histamine (Gardner *et al.*, 1996) diminuent l'expression de l'occludine et de ZO-1 favorisant ainsi l'augmentation de la perméabilité endothéliale.

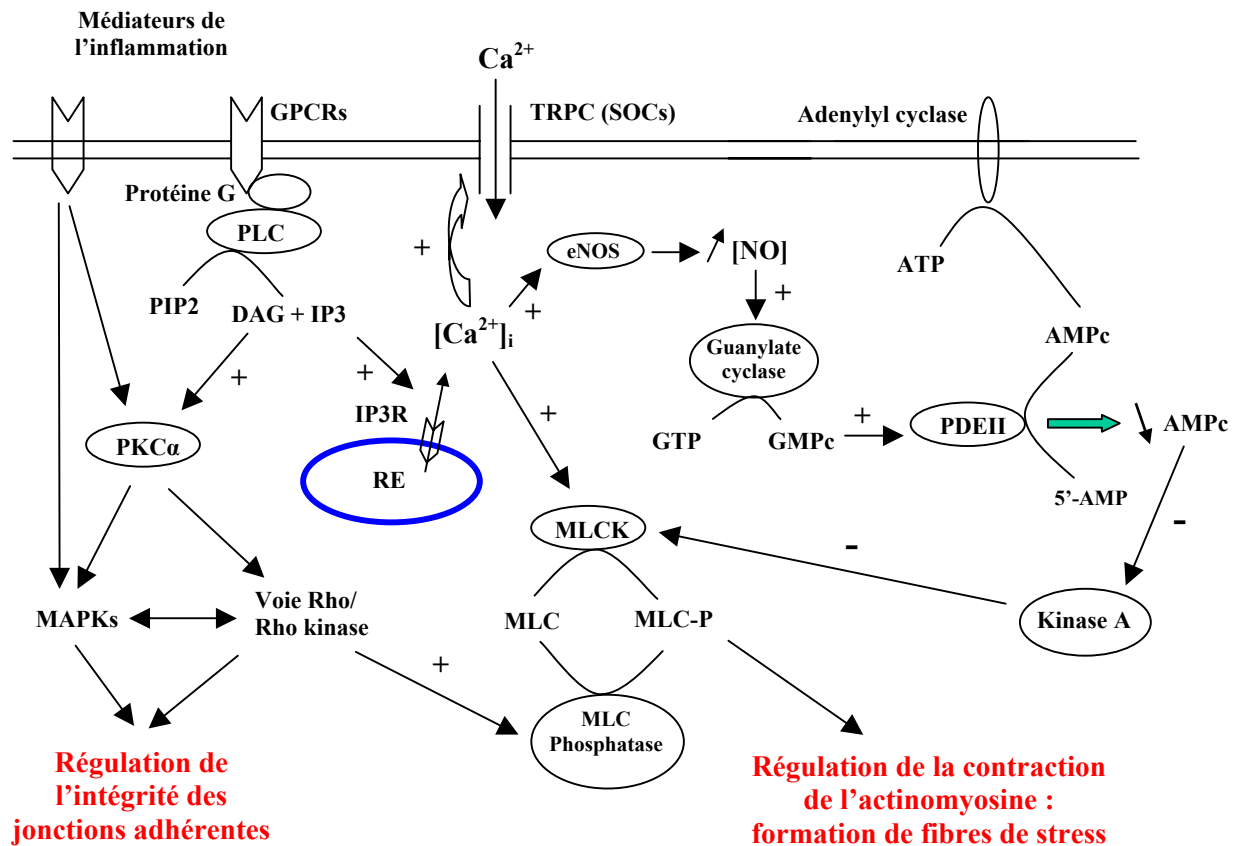


Figure 14: Voies de signalisation régulant la perméabilité de l'endothélium. Les abréviations correspondent respectivement à DAG : diacylglycerol, eNOS : NO synthase endothéliale, GPCRs : récepteurs couplés aux protéines G (G protein coupled receptors), IP3 : inositol 1,4,5 triphosphate, MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases, MLCK : (myosin light chain kinase), PDEII : phosphodiesterase II, PIP2 : phosphatidyl inositol 2 phosphate, PKC : protéine kinase C, PLC : phospholipase C, RE : réticulum endoplasmique, SOCs : Store Operated Channels, TRPC : Transient Receptor Potential Channel. D'après He *et al.*, 2000; Dudek et Garcia, 2001; Tiruppathi *et al.*, 2002.

La figure 14 présente les voies de signalisation qui dirigent la régulation de la perméabilité vasculaire. Dans des conditions de non inflammation, la perméabilité microvasculaire est régulée par la concentration intracellulaire de calcium $[Ca^{2+}]_i$, d'AMPc et de GMPc (voir les revues de Moore *et al.*, 1998; He *et al.*, 2000; Tiruppathi *et al.*, 2002). Le GMPc stimule la perméabilité alors que l'AMPc l'inhibe. La balance entre la concentration d'AMPc et de GMPc joue un rôle central pour maintenir la perméabilité basale. L'augmentation de la perméabilité est contrôlée par la $[Ca^{2+}]_i$. En effet, l'augmentation du calcium intracellulaire va déclencher une cascade de signalisation commençant par l'augmentation de la [NO] qui stimule l'activité de la guanylate cyclase augmentant par la même le GMPc. Celui-ci stimule la PDE II (phosphodiesterase II) qui va accélérer la dégradation d'AMPc. La diminution d'AMPc conduit à l'activation de la MLC kinase (Myosin Light Chain Kinase). Cette enzyme va contracter la myosine et l'actine périjonctionnelle et favoriser la formation de fibres de stress conduisant ainsi à l'arrondissement des cellules et à la rupture mécanique des jonctions. L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ se produit en deux phases. La première est la libération du calcium du réticulum endoplasmique (RE) dans le cytosol. La $[Ca^{2+}]_i$ élevée stimule l'entrée dans la cellule du calcium extracellulaire par les canaux calciques non sélectifs TRPC (Transient Receptor

Potential Channel) appelés aussi SOC (Store Operated Channels). L'activation des SOC indépendamment des récepteurs semble suffisante pour augmenter la perméabilité.

La protéine kinase A (PKA) inhibe la MLCK et donc la formation de fibres de stress. Elle permet également la phosphorylation de la VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) qui est associée à ZO-1 dans les jonctions serrées (Comerford *et al.*, 2002). La phosphorylation de la protéine VASP permet de diminuer la tension mécanique s'exerçant sur le cytosquelette préservant ainsi l'intégrité des jonctions serrées. Le NO, en tant que vasodilatateur, déclenche l'inactivation de la PKA et contribue à diminuer la perméabilité paracellulaire.

D'autre part, la libération intracellulaire du calcium implique également l'activation de récepteurs couplés à des protéines G. Cette activation permet le recrutement de la phospholipase C (PLC) localisée sur la membrane. La PLC catalyse alors l'hydrolyse de l'PIP₂ (phosphatidyl inositol 2 phosphate) pour produire l'IP₃ (inositol 1,4,5 triphosphate) et le DAG (diacylglycerol). L'IP₃ va se fixer sur son récepteur IP₃R à la surface du RE et favoriser le relargage du calcium. Le DAG, lui, active la PKC. La PKC α , en particulier, permet la régulation de la perméabilité endothéliale en agissant directement sur la désorganisation des complexes de VE-cadhérines en phosphorylant les protéines liant l'actine à la cadhérine comme la vinculine, la taline, la β -caténine (Sandoval *et al.*, 2001). La PKC α agit également, indirectement, sur la contraction des fibres d'actine et de myosine par l'intermédiaire de la voie Rho/Rho kinase (Huang *et al.*, 2005) ou de la voie des MAP Kinases (Siflinger-Birnboim et Johnson, 2003).

Il semble donc se dégager deux voies de signalisation différentes conduisant à l'augmentation de la perméabilité vasculaire en fonction des agonistes considérés (Dudek et Garcia, 2001). La première est MLCK dépendante et implique la fixation de l'agoniste sur un récepteur couplé aux protéines G conduisant à l'activation de la PKC et finalement de la MLCK. La seconde emprunte la même voie d'activation de la PKC mais celle-ci n'active pas la MLCK et ne modifie pas la $[Ca^{2+}]_i$.

La voie dépendante de la MLCK implique les espèces moléculaires d'oxygène réactifs comme les radicaux oxygène ($O_2^{\cdot-}$) et hydroxyl (OH^{\cdot}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui participent de l'inflammation. Le H_2O_2 , notamment, augmente la perméabilité aortique en augmentant la $[Ca^{2+}]_i$ et en activant la PKC (Lopez-Ongil *et al.*, 1999). Le H_2O_2 déclenche la même voie de signalisation dans des cellules endothéliales microvasculaires de cerveau (Fischer *et al.*, 2005) et de poumon (Siflinger-Birnboim *et al.*, 1996). Cependant, dans le cerveau, la PLC ne déclenche pas l'activation de la PKC mais active les MAP kinases p44/42 (Fischer *et al.*, 2005). Le peroxyde d'hydrogène semblent également impliqué dans le réarrangement de l'occludine et la dissociation de ZO-1 en augmentant l'activation des MAP Kinases ERK1/ERK2 dans les HUVEC (Kevil *et al.*, 2000) alors qu'il active plutôt la MAPK p38 dans l'artère pulmonaire (Niwa *et al.*, 2001). D'autres médiateurs de l'inflammation comme la thrombine et l'histamine, ont des récepteurs couplés aux protéines G et déclenchent la voie dépendante de MLCK (Zhao et Davis, 1999).

La seconde voie, indépendante de la MLCK, est déclenchée notamment par le TNF- α . Elle implique l'activation de MAP Kinases qui semble être au moins partiellement dépendante de la voie Rho/Rho kinase (Nwariaku *et al.*, 2002; Nwariaku *et al.*, 2003). Là encore, des différences dans les voies de signalisation sont observées en fonction du type de cellules endothéliales. Dans des cellules microvasculaires du poumon, les MAP kinases ERK et p38 jouent un rôle important dans l'augmentation de la perméabilité (Nwariaku *et al.*, 2003) alors que dans les HUVEC, bien que ces deux MAPK soient activées, l'inhibition de ERK ne réduit pas significativement l'effet du TNF- α sur la perméabilité endothéliale (Nwariaku *et al.*, 2002). D'autres auteurs montrent, au contraire, que le TNF- α active Rho mais aussi la MLCK (Wojciak-Stothard *et al.*, 1998).

Le TGF- β 1 augmente la perméabilité des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire par l'activation de la p38 MAPK induisant la phosphorylation des chaînes légères de myosine (Goldberg *et al.*, 2002).

Les deux voies de signalisation dépendantes et indépendantes de MLCK apparaissent complexes avec des connexions entre elles. Ce qui peut apparaître comme deux voies indépendantes pourrait être, en fait, différentes régulations d'une même grande voie qui seraient fonction de l'origine organique des cellules endothéliales et du type de vaisseaux dont elles sont issues. La complexité de cette signalisation vient du fait que les différentes Rho/Rho kinases, MAP Kinases et PKC sont aussi à des embranchements d'autres voies de signalisation régulant l'apoptose (Yilmaz *et al.*, 2003; McMullen *et al.*, 2005).

Dans le cas de la mucoviscidose, le mucus visqueux présent dans les voies aériennes permet l'installation d'une inflammation chronique qui peut évoluer vers la fibrose (Romano *et al.*, 2001). L'inflammation est caractérisée par la présence de cytokines pro-inflammatoires qui vont augmenter la perméabilité de l'endothélium pour permettre le passage des cellules immunitaires vers le site d'inflammation, c'est-à-dire les cellules épithéliales.

Dans le cas du cancer, les cellules tumorales sécrètent des facteurs favorisant l'angiogenèse comme le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Swidzinska *et al.*, 2004). Il intervient dans les premières étapes de l'angiogenèse en induisant la redistribution des molécules d'adhésion intercellulaires PECAM-1 et VE-cadhérine et des altérations de la structure membranaire via une induction de kinases (voir la revue de Bates *et al.*, 2002). Le VEGF active la voie de signalisation impliquant la PLC qui produit de l'IP3 et du DAG, l'influx de Ca^{2+} , la PKC ainsi que les MAPK ERK (Breslin *et al.*, 2003; Zachary, 2003). Cette augmentation du calcium intracellulaire conduit à une hyperperméabilité et une néovascularisation (Conway *et al.*, 2001). Jin et collaborateurs (2001) ont montré que VEGF était directement responsable du remodelage de l'endothélium des capillaires alvéolaires et de l'ouverture des jonctions intercellulaires lors de la prolifération d'adénocarcinomes primaires.

Cette augmentation de la perméabilité pourrait favoriser le passage de polyplexes à travers l'endothélium.

2) Les voies intracellulaires.

2.1) Les fenestrae.

Ces structures sont formées par la fusion de vésicules qui forment un canal intracytoplasmique reliant le côté apical et le côté basolatéral des cellules. Ces structures se rencontrent dans les endothelia fenestrés et discontinus dans les reins, les intestins, le foie et la rate. Il existe des similitudes biochimiques entre les fenestrae et les cavéoles. Stan et collaborateurs (1999) ont suggéré que les fenestrae seraient formées par la fusion de plusieurs cavéoles. Cependant, la cavéoline-1 est exclue de la région fenestrée de l'endothélium glomérulaire (Sorensson *et al.*, 2002). Il semble donc que les cavéoles ne fusionnent pas pour former des fenestrae, au moins dans l'endothélium glomérulaire. Ainsi, l'idée que les fenestrae et les cavéoles seraient une seule et même structure est encore discutée aujourd'hui.

Dans le cerveau et les poumons, l'endothélium est considéré comme continu et ne possède pas ou peu ces structures. Cependant, les artéioles conduisant aux bronches terminales sont fenestrés (Magno, 1990). Des conditions d'inflammation sont présentes dans le cas de la mucoviscidose et des cancers pulmonaires qui évoluent souvent vers des fibroses (Griffin, 1995). Dans ces conditions, l'endothélium des capillaires alvéolaires, normalement continu, se transforme en endothélium discontinu, fenestré (Kawanami *et al.*, 1992). De plus, lors de l'angiogénèse, les tumeurs primaires induisent une fenestration de l'endothélium (Roberts et Palade, 1995; Jin *et al.*, 2001).

Cette voie n'est donc pas exploitable pour le transfert de gènes en utilisant le système circulatoire fonctionnel car, au niveau des alvéoles pulmonaires, l'endothélium est continu sauf en conditions d'inflammation sévère. Cependant, le système circulatoire nutritif pulmonaire pourrait être exploité car il conduit à un endothélium fenêtré au niveau des bronches terminales. Bakhai et collaborateurs (2002) proposent d'utiliser ce système circulatoire nutritif en injectant les vecteurs directement dans l'artère bronchique. En effet, dans le modèle du mouton que suggèrent d'utiliser ces auteurs, l'artère bronchique alimente les bronches terminales *via* des artérioles qui n'ont pas de lame basale définie et qui sont fenestrées (Magno, 1990). De plus, l'administration d'un adjuvant (histamine VEGF) augmentant la perméabilité vasculaire avant l'injection du vecteur devrait permettre de transférer efficacement l'épithélium bronchique et les glandes submucosales où le mucus est principalement produit.

2.2) La transcytose.

La transcytose est le processus par lequel un cargo est internalisé depuis un domaine de la membrane plasmique d'une cellule polarisée et transporté *via* une vésicule vers le domaine membranaire opposé. La transcytose, comme l'endocytose, peut être un processus non spécifique ou récepteur spécifique et peut être bidirectionnelle (voir la revue de Tuma et Hubbard, 2003). La voie cavéolaire est la voie principale de transcytose dans les cellules endothéliales. L'insuline, l'albumine, le LDL traversent l'endothélium par cette voie (voir la revue de Simionescu *et al.*, 2002).

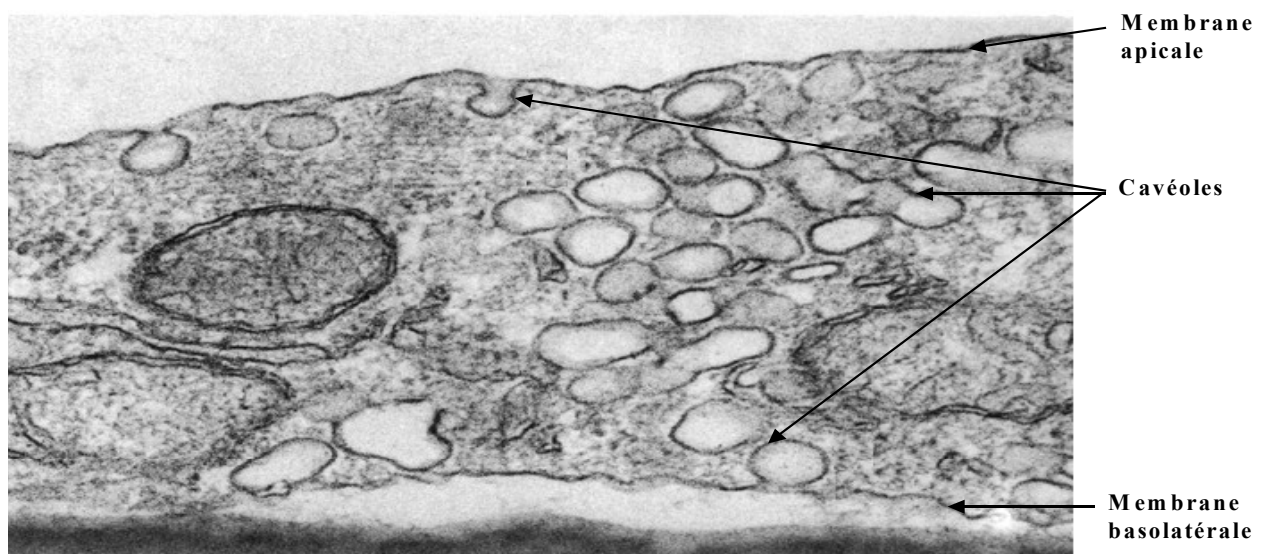


Figure 15 : Photo de microscopie électronique de cellules endothéliales microvasculaires de poumon humain. D'après Predescu *et al.*, 2001.

Dans les régions alvéolaires, l'endothélium forme une couche très fine de l'ordre de 0,2 à 0,5 μm (figure 15). Dans ces zones, les cavéoles pourraient fusionner pour former un canal continu reliant les côtés apical (lumen des vaisseaux) et basolatéral (lame basale). Dans l'endothélium continu, la fréquence des cavéoles dépend de l'organe. Par exemple, le nombre de cavéoles dans l'endothélium musculaire du diaphragme est estimé à $1200/\mu\text{m}^3$ alors qu'il est de seulement $130/\mu\text{m}^3$ dans les capillaires pulmonaires (Simionescu, 1983).

Le trafic cavéolaire peut être divisé en quatre étapes qui comprennent la formation des vésicules, le mouvement des vésicules vers la membrane opposée, l'attachement/reconnaissance avec la membrane réceptrice et leur fusion. Des molécules particulières, les protéines Rab et SNARE, assurent la spécificité de l'attachement des vésicules et de la fusion (Schnitzer *et al.*, 1995; Predescu *et al.*, 2001).

Des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), des canaux calciques, la NO synthase endothéliale (eNOS) sont enrichis dans les cavéoles. Le VEGFR-2 (Flk-1), impliqué dans la phosphorylation de ERK induite par le VEGF (Cho *et al.*, 2004) et le récepteur du TNF- α sont également enrichis dans ces structures (Ko *et al.*, 1999). La plupart des récepteurs et des enzymes associées, impliqués dans la signalisation régulant la perméabilité vasculaire se trouve dans les cavéoles.

Miller et collaborateurs (2005) ont montré que le TNF- α augmentait la transcytose de la holotransferrine à travers un modèle *in vitro* de barrière endothéliale du cerveau en phosphorylant les MAPK p42-44 sans provoquer de changement de la perméabilité paracellulaire. Les cavéoles sont donc impliquées à la fois dans la perméabilité paracellulaire et dans la transcytose. Il semble raisonnable de penser que, dans des conditions d'inflammation telles que celles rencontrées dans la mucoviscidose et les cancers du poumon, la perméabilité paracellulaire pourrait l'emporter sur la transcytose.

La possibilité de cibler les cavéoles pour transférer des drogues dans le poumon a été essayée avec l'anticorps TX3.833. McIntosh et collaborateurs (2002) ont mis au point un anticorps monoclonal spécifique d'une protéine de 90 kDa située dans les cavéoles de l'endothélium microvasculaire du poumon. Cet anticorps est capable de traverser l'endothélium et l'épithélium. Conjugué à une immunotoxine, l'anticorps TX3.833 provoque une réaction inflammatoire uniquement dans les poumons.

Le mécanisme de transcytose de l'albumine à travers l'endothélium microvasculaire est aujourd'hui bien connu (Ghitescu *et al.*, 1986; Vogel *et al.*, 2001), d'où l'idée de concevoir des vecteurs couplés à l'albumine. La PEI a notamment été couplée à l'albumine et s'est montrée efficace pour transfecter des cellules épithéliales (Carrabino *et al.*, 2005). Des études *in vivo* ont montré que de telles particules s'accumulaient dans l'interstitium alvéolaire sans provoquer d'inflammation (Orson *et al.*, 2000).

Compte tenu de l'importance des cavéoles dans la transcytose et dans la régulation de la perméabilité paracellulaire, le ciblage de ces structures apparaît être une voie d'étude importante pour le passage transendothélial de gènes par voie systémique.

Il existe également une transcytose dépendante de la clathrine (Tuma et Hubbard, 2003). Celle-ci a été mise en évidence lors de la transcytose de l'IgA polymérique du côté basolatéral vers le côté apical dans des hépatocytes, des entérocytes et des cellules épithéliales de rein (MDCK). Cette voie de transcytose est également présente dans les cellules endothéliales. La gonadotrophine chorionique (HCG) est une hormone peptidique internalisée du côté apical de l'endothélium testiculaire via la voie dépendante de la clathrine et elle est ensuite transportée du côté basolatéral (Ghinea *et al.*, 1994).

IV] LE FLUX SANGUIN.

Dans une administration systémique, la première barrière rencontrée par tout système de transfert de gènes est le sang. Ces caractéristiques physiques et sa composition vont agir sur les particules injectées et les cellules endothéliales.

A] Les caractéristiques du flux sanguin.

L'hémodynamique est gouvernée par la dynamique des fluides qui permet d'expliquer l'écoulement d'un fluide dans une conduite cylindrique rectiligne. Cet écoulement s'effectue soit sous un régime d'écoulement laminaire c'est-à-dire que les couches du liquide glissent les unes sur les autres sans échange de particules soit sous un régime turbulent ce qui signifie que les couches de liquides se mélangent avec apparition de tourbillons. On peut déterminer le type de régime en calculant le nombre de Reynolds donné par :

$$Re = (\rho \cdot v \cdot D) / \eta$$

Avec ρ = masse volumique du fluide ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), v = vitesse moyenne ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), D = diamètre hydraulique de la conduite (m), η = viscosité dynamique du fluide (Pa.s).

Si $Re < 2000$, le régime est laminaire, $2000 < Re < 3000$, le régime est intermédiaire et $Re > 3000$, le régime est turbulent.

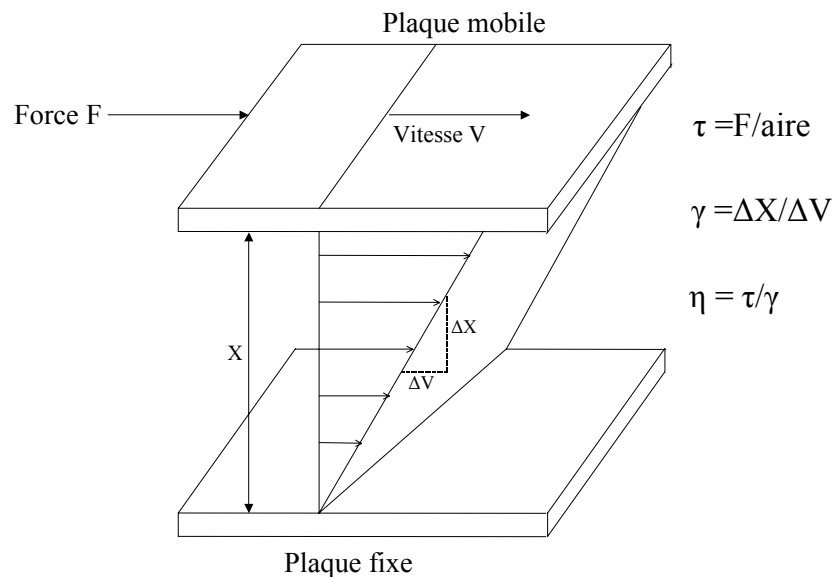


Figure 16: Schéma des contraintes appliquées sur une surface par un liquide. τ représente les contraintes de cisaillement, γ la vitesse ou taux de cisaillement et η la viscosité.

La figure 16 nous montre la force qu'exerce une plaque mobile sur une plaque fixe par l'intermédiaire d'un liquide. La contrainte de cisaillement (τ) est la force qu'exerce le liquide par son mouvement sur la surface fixe.

Contrairement à la figure 16, dans un vaisseau sanguin où les parois sont immobiles, le gradient de vitesse a un profil parabolique c'est-à-dire que la vitesse est plus faible au niveau des parois et est la plus élevée au milieu du vaisseau.

Lorsque l'écoulement est laminaire, on peut écrire la relation suivante entre la vitesse volumique et les contraintes de cisaillement :

$Q = (\tau w.h^2) / 6\mu$ où μ est la viscosité du milieu exprimée en dyn-s/cm², w la largeur interne de la conduite exprimée en cm et h la hauteur interne de la conduite exprimée en cm, τ la contrainte de cisaillement exprimée en dyn/cm², Q le flux exprimé en cm³/s.

Si un liquide a une viscosité constante quelle que soit la valeur de la contrainte de cisaillement appliquée, il est dit newtonien. Si la viscosité d'un liquide varie selon la contrainte de cisaillement appliquée, il est dit non newtonien. Le sang est non newtonien du fait de la présence des cellules sanguines (Thurston, 1994). Cependant, le plasma, dont la viscosité est d'environ $1,4.10^{-2}$ dyn-s/cm², a un comportement parfaitement newtonien.

Les contraintes de cisaillement ne sont pas identiques tout au long du système circulatoire. Il existe, en effet, une gamme de contraintes qui va de quelques dixième de dyn/cm² dans les capillaires jusqu'à quelques dizaines dans les artères. De manière générale, un flux turbulent se rencontre à l'intersection de vaisseaux sanguins alors que dans un vaisseau, le flux est laminaire.

De plus, le sang est expulsé du cœur dans les artères d'une manière pulsée. Ce flux pulsé est surtout présent dans les artères et diminue avec le diamètre des vaisseaux. Dans le reste des vaisseaux (artérioles, capillaires et veines), le flux est continu.

B| Les effets du flux sanguin sur les cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales sont soumises à des contraintes de cisaillement (shear stress en anglais) résultant du flux sanguin. Ces forces sont converties en signaux intracellulaires qui affectent les fonctions cellulaires (voir la revue Li *et al.*, 2005).

1) Les effets des contraintes de cisaillement sur les cellules endothéliales.

De façon générale, on peut dire que les contraintes de cisaillement modulent l'expression des gènes qui codent pour des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion, des substances vasoactives, des molécules piègeuses d'oxygène, des facteurs de coagulation et des chimio-attracteurs. Ce remodelage phénotypique est différent suivant la nature du flux (Tableau 12). Un flux laminaire (LSS) induit l'expression de gènes codant des protéines ayant des propriétés anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et anti-prolifératives permettant une résistance à l'athérosclérose. Un flux turbulent (TSS) favorise les effets opposés. En utilisant des puces à ADN, Ohura et collaborateurs (2003) ont montré que, dans les artères, un flux laminaire de 15 dyn/cm² modifie l'expression d'approximativement 3% des gènes, alors que dans les veines, avec un flux de 1.5 dyn/cm², la modification est de 2%.

Un flux laminaire diminue le taux de prolifération cellulaire alors qu'un flux turbulent induit une prolifération plus importante qu'en absence de flux. Une augmentation de la prolifération cellulaire pourrait provoquer un élargissement des jonctions qui permettrait un passage des macromolécules autour des cellules en mitose. Plusieurs équipes ont montré, *in vivo*, au niveau des cellules mortes ou en mitose une augmentation de la fixation et du passage de macromolécules telles que le LDL ou la HPR (Chuang *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1997).

De plus, le LSS exerce des effets suppresseurs sur l'apoptose, ce qui contribuerait à l'intégrité de l'endothélium. Des contraintes de cisaillement laminares favoriseraient les interactions entre les cellules endothéliales et la matrice extracellulaire, le remodelage des adhésions focales entre cellules et le déploiement des lamellipodes dans la direction du flux (Davies *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2002). Elles augmenteraient ainsi la capacité de migration des cellules. De même, le LSS remodèle l'organisation des microtubules conduisant à un alignement et une elongation des cellules endothéliales dans le sens du flux. Tout d'abord, les jonctions intercellulaires se désorganisent, puis les centres organisateurs des microtubules

augmentent et se relocalisent avec le noyau dans la partie en amont du corps cellulaire par rapport au sens du flux. Le déplacement des filaments intermédiaires de vimentine est plus élevé en aval et au dessus du noyau (côté luminal) (Helmke *et al.*, 2001). Enfin, les fibres de stress et les microfilaments s'alignent dans le sens du flux et les jonctions se reforment.

Les contraintes de cisaillement activent les voies de signalisation conduisant à un remodelage du cytosquelette et des jonctions intercellulaires favorisant l'augmentation de la perméabilité. En réponse à des contraintes laminaires, le réseau de VE-cadhérine devient plus compact et plus uniforme (Ukropec *et al.*, 2002). L'actine corticale s'organise en fibres de stress alignées dans la direction du flux. Un changement de la composition des jonctions adhérentes a lieu avec la perte d' α -caténine. Un flux perturbé ou turbulent provoque des interruptions dans ce réseau de VE-cadhérine (Miao *et al.*, 2005).

Ce remodelage du cytosquelette modifie les propriétés mécaniques des cellules. La raideur de la membrane plasmique mesurée par microscopie à force atomique de cellules soumises à des forces de cisaillement de 20 dyn/cm² est plus élevée côté amont du corps cellulaire par rapport au sens du flux (Sato *et al.*, 2000). Cependant cette différence disparaît après 24 h.

Tableau 12: Réponses des cellules endothéliales à différents types de flux.
D'après Li et al., 2005.

Flux laminaire/pulsatif	Flux perturbé/oscillatoire
ECs turnover faible	ECs turnover élevé
Accumulation de LDL faible	Accumulation de LDL élevée
Synthèse d'ADN faible	Synthèse d'ADN élevée
Activation des SREBP (sterol regulatory element binding protein 1) transitoire	Activation des SREBP (sterol regulatory element binding protein 1) soutenue
Phénotype aligné	Phénotype polygonal
Faible expression des molécules d'adhésion, inflammatoire et chimiokines	Expression élevée des molécules d'adhésion, inflammatoire et chimiokines
Stress oxydatif réduit	Elevation du stress oxydatif

2) Les mécano-senseurs des contraintes de cisaillement.

Le glycocalyx est directement en contact avec le flux sanguin et joue ainsi un rôle dans la transduction des contraintes de cisaillement mécaniques vers le cytosquelette. Les modèles mathématiques montrent que les glycoprotéines transmettent les contraintes de cisaillement à l'actine corticale (Damiano, 1998; Weinbaum *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que les

héparanes sulfates induisent une production de NO en réponse aux forces mécaniques appliquées à des cellules endothéliales aortiques bovines (Florian *et al.*, 2003).

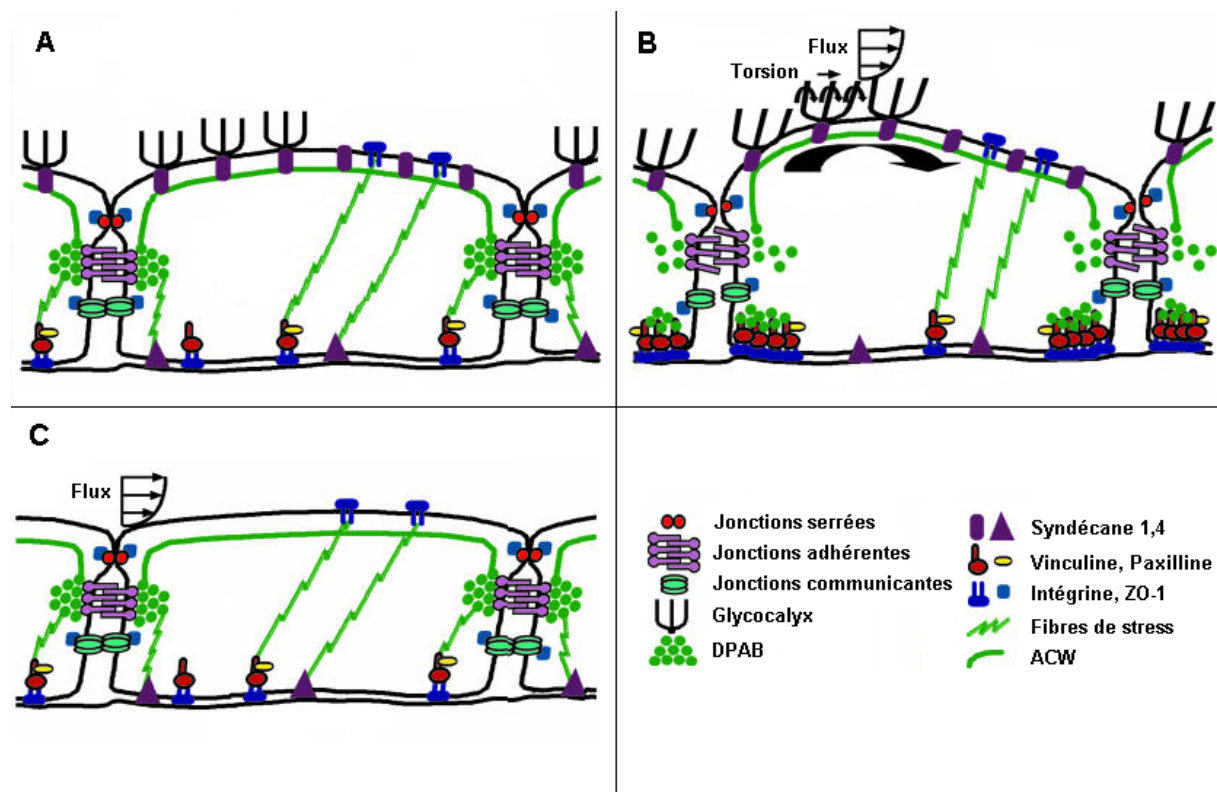


Figure 17: Schéma représentant les effets des contraintes de cisaillement sur le glycocalyx et le cytosquelette. A : situation en absence de flux. Les figures montrent la réponse aux contraintes de cisaillement pour un glycocalyx intact (B) et un glycocalyx désorganisé (C). Les abréviations correspondent respectivement à DPAB : bande périphérique dense d'actine (dense peripheral actin band), ACW : réseau d'actine corticale (actin cortical web). D'après Thi *et al.*, 2004.

Les protéoglycanes sont reliés aux bandes périphériques denses d'actine (DPABs) par l'intermédiaire du réseau d'actine corticale (ACW) (Figure 17A). Les DPABs relient le ACW aux jonctions adhérentes. D'autre part, les fibres de stress font le lien à la fois entre les jonctions adhérentes et les adhésions focales (formées par la vinculine, la paxilline, des intégrines et le syndécan) et entre la membrane plasmique apicale et basale. Récemment, Thi et collaborateurs (2004) ont présenté un modèle expliquant les effets des contraintes de cisaillement sur le cytosquelette (Figure 17B). Les contraintes de cisaillement sont transmises au ACW via les protéoglycanes. Lorsque ces forces dépassent un certain seuil, elles provoquent la rupture entre les jonctions adhérentes et les DPABs qui se fragmentent. Ces fragments d'actine sont alors recrutés pour former de nouvelles fibres de stress. De plus, la vimentine se déplace vers les zones jonctionnelles basales formant de nouvelles adhésions focales qui stabilisent les cellules. Il existe de nombreuses voies de signalisation qui sont activées par les molécules formant les adhésions focales de la membrane basale. Le syndécan 4, notamment, est un protéoglycane transmembranaire ubiquitaire qui active la PKC α régulant ainsi la voie de signalisation des GTPases de la famille Rho et la FAK (Bass et Humphries, 2002). Les contraintes de cisaillement vont donc agir sur les adhésions focales soit par l'intermédiaire des protéoglycanes soit par les fibres de stress reliant directement les deux pôles de la cellule. Le cytosquelette compose donc un réseau structuré qui permet de transmettre les forces mécaniques entre les domaines apical et basolatéral, les jonctions cellulaires et l'intérieur de la cellule (Illi *et al.*, 2003).

Les protéoglycanes et glycoprotéines atténuent les contraintes de cisaillement sur la membrane plasmique. Lorsque le glycocalyx est absent, les contraintes de cisaillement agissent directement sur la membrane plasmique (figure 17C). La transmission de ces forces d'une cellule à une autre dépend largement des jonctions serrées (Fung et Liu, 1993) mais ne se fait plus vers le ACW. Les DAPBs restent intactes et les jonctions adhérentes stables.

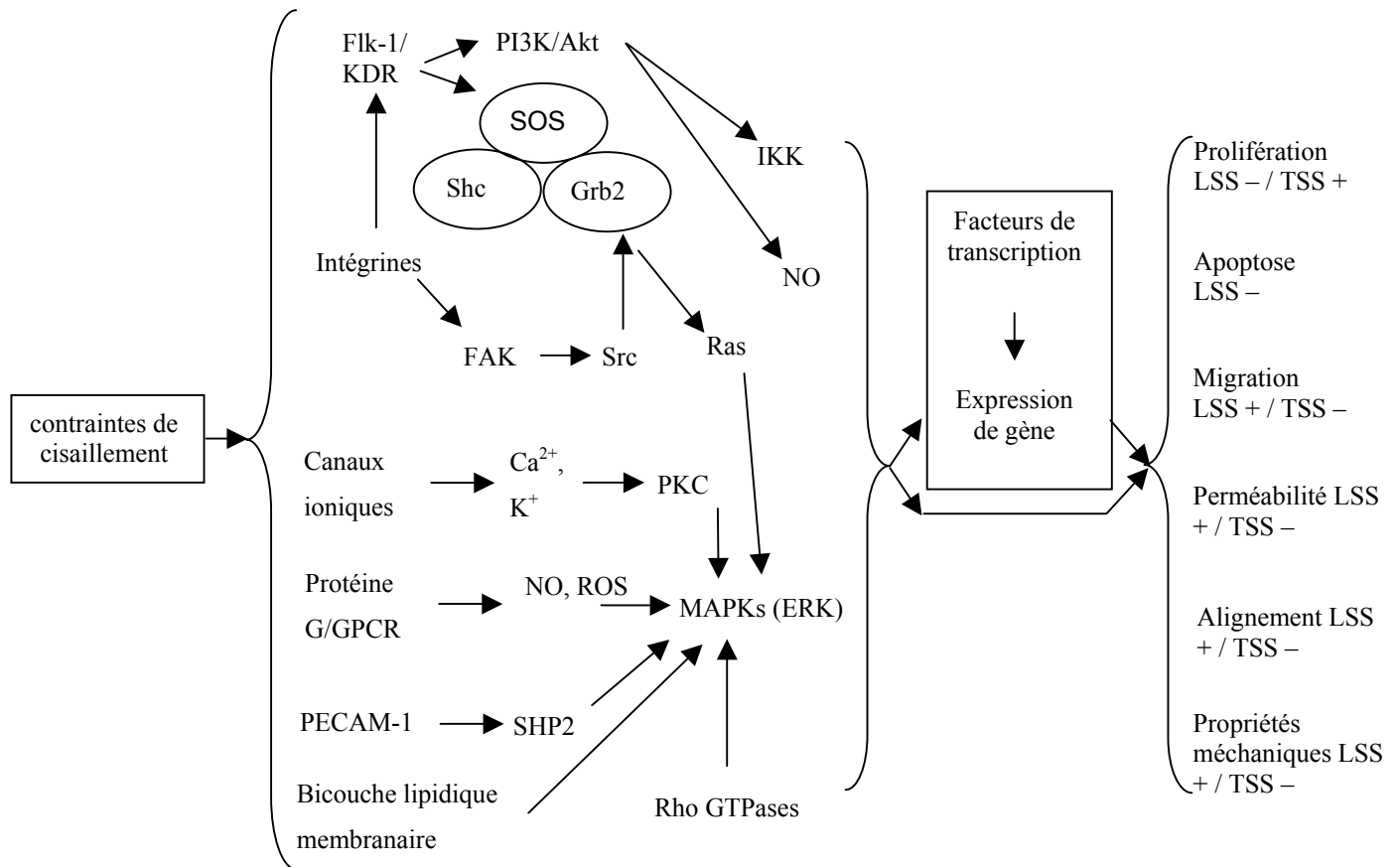


Figure 18: Schéma des effets des contraintes de cisaillement sur les fonctions des cellules endothéliales. LSS : contraintes de cisaillement laminaire (laminar shear stress), TSS : contraintes de cisaillement turbulentes (turbulent shear stress). ERK : kinases régulées par un signal extracellulaire (extracellular signal-regulated kinases). FAK : kinase d'adhésion focale (focal adhesion kinase). Flk-1 : récepteur de VEGF. IKK : kinases spécifiques de la protéine I κ B. MAPK : MAP kinase. NO : monoxyde d'azote. NSC : canaux cationiques non sélectifs. PECAM-1 : molécule d'adhésion cellules endothéliales-plaquettes. PI3K : phospho-inositol-3 kinase. PKC : protéine kinase C. ROS : espèces réactives de l'oxygène. RTK : récepteurs à activité tyrosine kinase. SHP-2 : tyrosine phosphatase. D'après Li *et al.*, 2005.

Cependant, il a été montré que la diffusion des lipides dans la membrane plasmique augmentaient en amont du flux et diminuaient en aval (Butler *et al.*, 2001). Ce renouvellement lipidique de la membrane plasmique conduit à une discrimination spatiale. Cette fluidité membranaire favorise l'activation de ERK et une autre MAP kinase, la JNK (c-Jun N-terminal kinases).

Un certain nombre de récepteurs à la surface des cellules jouant le rôle de mécanosenseur a également été mis en évidence notamment les intégrines, les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), les canaux ioniques, les récepteurs des protéines G, les molécules d'adhésion (voir la figure 18).

Les intégrines lient par leur domaine extracellulaire des ligands de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, la vitronectine et le collagène. Le domaine

cytoplasmique interagit dans les sites d'adhésion focale avec des signaux moléculaires tels que la protéine kinase d'adhésion focale (FAK), la c-Src et les protéines taline et α -actinine du cytosquelette. La cavéoline-1 joue un rôle dans la mécano-transduction des intégrines. En effet, les forces de cisaillement conduisent des kinases de la famille des Src à phosphoryler la cavéoline-1. La cavéoline-1 phosphorylée permet l'association de la kinase Csk (régulateur négatif des kinases de la famille Src) avec l'intégrine $\beta 1$. Le complexe Csk/intégrine $\beta 1$ joue un rôle dans la phosphorylation des chaînes légères de myosines (MLCs) (Radel et Rizzo, 2005).

Les contraintes de cisaillement activent les RTK comme VEGFR2 (nommé Flk-1 chez la souris et KDR chez l'homme), le récepteur du VEGF. Ce récepteur est alors oligomérisé, phosphorylé et s'associe avec la protéine adaptatrice Shc. Le blocage des intégrines atténue l'activation de Flk-1 suggérant qu'elles seraient en amont du réseau moléculaire des mécano-senseurs.

Les contraintes de cisaillement augmentent l'absorption de Ca^{2+} ce qui a pour conséquence de réguler la signalisation cellulaire à travers l'activation des canaux cationiques non sélectifs (NSC), des canaux Cl^- et des canaux K^+ activés par le Ca^{2+} .

Les forces exercées sur les cellules endothéliales par le flux sanguin activent également les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) et la protéine d'adhésion intercellulaire PECAM-1. Cette protéine est exprimée dans les leucocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales où elle joue un rôle important dans l'agrégation des leucocytes et l'interaction cellules endothéliales /leucocytes. La PECAM-1 est aussi localisée dans les jonctions entre les cellules endothéliales. Lorsqu'elle est activée, elle recrute la tyrosine phosphatase SHP-2 au niveau des jonctions. Le complexe PECAM-1/SHP2 phosphoryle la MAP kinase (MAPK) ERK.

Comme le montre la figure 18, l'ensemble des mécano-senseurs active des voies de signalisation impliquant les PI3K, les FAK, les GTPases de la famille Rho, la PKC et converge vers les MAPKs. Celles-ci activent à leur tour des facteurs de transcription qui modulent l'expression des gènes conduisant aux modifications phénotypiques décrites plus haut.

Un grand nombre de ces mécano-senseurs sont localisés dans les cavéoles (Rizzo *et al.*, 2003). Un flux laminaire peut stimuler la formation de cavéoles au niveau de la surface apicale des cellules endothéliales par translocation de la cavéoline-1 de l'appareil de Golgi vers la membrane apicale (Rizzo *et al.*, 2003). Ce recrutement des cavéoles permet d'augmenter le nombre de mécano-senseurs à la surface des cellules endothéliales pour leur permettre de répondre efficacement aux conditions de flux. Cependant, on ne sait pas quel est l'effet de ce recrutement sur la transcytose.

C| Ce que l'on sait sur le comportement des polyplexes PEI et pLK dans le flux sanguin.

De par leurs charges positives, les polyplexes fixent des protéines sériques et des cellules sanguines et forment des agrégats affectant leur biodistribution (Ogris *et al.*, 1999; Bello Roufai et Midoux, 2001; Opanasopit *et al.*, 2002). Des polyplexes pLK fixent l'albumine et forment alors un complexe ternaire qui pourrait être éliminé par phagocytose (Dash *et al.*, 1999). Ces agrégats en activant le Complément peuvent rapidement être éliminés par le foie (Ward *et al.*, 2001). Pour des polyplexes formés avec la pLK, le PAMAM, la PEI, le degré d'activation du Complément est dépendant du ratio de charge N/P (Plank *et al.*, 1996).

Après une injection dans la veine de la queue de la souris, la première barrière rencontrée par ces agrégats est le poumon. Ceux-ci se bloquent dans les microvaisseaux pulmonaires (Chollet *et al.*, 2002). Ce phénomène peut favoriser la transfection des poumons sans provoquer de réaction inflammatoire. Nous avons déjà vu que des polyplexes formés avec le PEI linéaire de 22 kDa étaient capables de transférer les cellules endothéliales et les pneumocytes de type I et II au niveau des alvéoles par un processus non inflammatoire (Goula *et al.*, 1998; Bragonzi *et al.*, 2000; Goula *et al.*, 2000). D'autres auteurs ont, au contraire, montré qu'une injection systémique provoquait une inflammation (Norman *et al.*, 2000; Gopalan *et al.*, 2004). L'efficacité de transfection du poumon avec la PEI semble être due à la formation de ces agrégats participant au blocage des polyplexes dans les microvaisseaux.

Pour diminuer la possible inflammation provoquée par les polyplexes et leur élimination par le foie, les vecteurs ont été transformés pour augmenter leur temps de circulation dans le sang (Oupicky *et al.*, 2002). Le PEG est la molécule la plus utilisée pour éviter les interactions non spécifiques (Ogris *et al.*, 2001a; Petersen *et al.*, 2002). Couplée à des polyplexes pLK préformés, elle permet de réduire considérablement l'activation du Complément (Plank *et al.*, 1996). La transférine s'est également montrée efficace pour protéger les complexes PEI (Kircheis *et al.*, 2001a).

Cependant, de tels polyplexes ayant un potentiel ζ proche de la neutralité ont des interactions non spécifiques vis à vis des cellules réduites et sont beaucoup moins efficaces pour transférer les poumons (Kircheis *et al.*, 2001b; Kim *et al.*, 2004). L'utilisation de ces vecteurs nécessite donc un signal leur permettant d'être captés par les cellules cibles (Woodle *et al.*, 2001).

L'influence du flux sanguin sur les polyplexes ou les lipoplexes n'est pris en compte que depuis quelques années. La complexité de la circulation sanguine nécessite d'utiliser un système *in vitro* intégré modélisant au mieux les microvaisseaux pulmonaires. L'étude de l'adhésion, des capacités de transfection et du ciblage des cellules endothéliales en conditions de flux permettra alors d'obtenir des informations intéressantes pour la conception de vecteurs efficaces *in vivo*.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MATÉRIELS ET MÉTHODES

II LES POLYMERES CATIONIQUES.

La poly-L-lysine, HBr (pLK, degré de polymérisation = 190) de chez Bachem Feinchemikalien (Bubendorf, Suisse) a été passée (1 g dans 200 ml d'eau) sur une colonne échangeuse d'anions (Dowex 2x8, forme OH⁻, Bio-Rad, Richmond, CA, USA) pour éliminer les ions bromures (Derrien *et al.*, 1989). La solution contenant la polylysine a été ensuite neutralisée avec une solution d'acide *p*-toluène sulfonique à 10% dans de l'eau puis lyophilisée.

La poly-L-lysine histidylée (pLK-His) a été préparée comme décrit dans Midoux et Monsigny, 1999 et contient 109 résidus histidyles par molécule de polymère. Le sel de *p*-toluène sulfonate de pLK dissout dans du DMSO en présence de diisopropylethylamine, réagit avec (Boc)His(Boc)-OH pendant 24 h à 20°C en présence de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino) phosphonium hexafluorophosphate. Les groupes Boc sont enlevés par un traitement acide en ajoutant 20 ml d'une solution de H₂O/acide trifluoroacétique (1:1 ; v/v) pendant 24 h à 20°C. Le polymère est ensuite précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol et centrifugé pendant 15 min à 1800 g. Le culot est lavé avec de l'isopropanol, centrifugé, solubilisé dans de l'eau distillée et lyophilisé.

La polyéthylèneimine (Jet-PEI™), un polymère cationique linéaire de 22 kDa nous a été fourni par la société Polyplus transfection S.A.S. (Illkirch, France).

III LES PLASMIDES.

Les plasmides utilisés sont le pUT650 (5,15 kpb, Cayla, Toulouse, France) et le pSV2Luc (5 kpb) contenant le gène rapporteur de la luciférase de *photinus pyralis* sous le contrôle respectivement du promoteur CMV (*Cytomégalovirus*) humain et de l'antigène T large du SV40 (*simian virus-40*). Le plasmide pUT650 est utilisé pour l'expression de gène. Le plasmide pSV2luc est utilisé pour étudier l'internalisation et le trafic intracellulaire des polyplexes par cytométrie en flux et microscopie confocale. Celui-ci est produit par amplification dans des bactéries *E. coli* Top10. Il est ensuite extrait des bactéries et purifié avec le kit QIAGEN plasmid Mega (QIAGEN, Hilden, Allemagne). Le plasmide pSV2luc est marqué avec un intercalant, le YOYO-1 (491/509, Molecular Probes, Leiden, Netherlands) qui est additionné à la solution de plasmide à un ratio d'une molécule fluorescente pour 300 paires de bases. La solution est ensuite dialysée une nuit à 4°C.

Ce plasmide a également été fluorescéinylé en utilisant le kit Label IT (fluorescein nucleic acid labeling kit, MIRUS, Madison, WI, USA) dans un rapport réactif/ADNp égal à 1/1 (v/m). 5 µg d'ADNp dans 35 µl d'eau ont été mélangés à 0,1 µg/µl de réactif repris dans du DMSO pendant 1 h à 37°C. Ensuite, le mélange a été précipité, lavé à l'éthanol puis séché avant d'être repris dans l'eau à 1 µg/µl.

III] CELLULES ET CULTURE CELLULAIRE.

A] Lignées de cellules utilisées.

La lignée cellulaire HLMEC est une lignée de cellules endothéliales humaines des microvaisseaux du poumon. Elle a été établie par le Dr C. Kieda (Kieda *et al.*, 2002) au Centre de Biophysique Moléculaire.

La lignée cellulaire Σ CFTE290- est une lignée de cellules épithéliales humaines des voies respiratoires immortalisées possédant la mutation homozygote Δ F508 du gène *CFTR*. Elle nous a été généreusement donnée par le Dr D.C. Gruenert (Cardiovascular Research Institute, San Francisco, CA, USA).

Les cellules HLMEC sont mises en culture à raison de 10^5 cellules dans des boîtes de culture (75 cm^2). Le milieu de culture est de l'OptiMEM (Life Technologies Gibco, Renfrewshire, UK) contenant 2% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco) décomplémenté à la chaleur, avec 2 mM de L-glutamine, des antibiotiques (100 unités/ml de pénicilline et 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine, Gibco) et un anti-fongique, la Fungizone (Sigma, St Louis, MO, USA). Après cinq jours de culture à 37°C dans une étuve humidifiée contenant 5% de CO_2 , les cellules sont décollées par un traitement au PET (PBS avec 0,02% d'EDTA et 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de trypsine) à 37°C pendant 10 min.

Les cellules Σ CFTE290- sont mises en culture à raison de $5 \cdot 10^5$ cellules dans des boîtes de culture (75 cm^2). Le milieu de culture est du MEM (Life Technologies Gibco, Renfrewshire, UK) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco) non décomplémenté, avec 2 mM de L-glutamine et des antibiotiques (100 unités/ml de pénicilline et 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine, Gibco). Les boîtes de culture sont incubées au préalable pendant 20 min à 37°C avec du MEM contenant de la fibronectine (0,01 mg/ml), du collagène I (0,03 mg/ml) et de la sérum albumine bovine (0,1 mg/ml, SAB). Après une semaine à 37°C dans une étuve humidifiée contenant 5% de CO_2 , les cellules sont décollées par un traitement au PET (PBS avec 0,02% d'EDTA et 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de trypsine) à 37°C pendant 10 min.

Un test pour vérifier l'absence de mycoplasmes a été réalisé périodiquement avec du bisbenzimidazole (Chen, 1977).

B] Culture des cellules polarisées.

Les cellules HLMEC sont ensemencées à $5 \cdot 10^4$ cellules sur un insert (Falcon, BD biosciences, Le Pont de Claix, France) de polyéthylène téréphtalate (PET) ayant des pores de 3 μm de diamètre et $8 \cdot 10^5$ pores/ cm^2 .

Les cellules sont cultivées dans le milieu EBM-2 contenant 5% (v/v) de FBS, 0.1% (v/v) d'acide ascorbique, 0.04% (v/v) d'hydrocortisone, 0.1% (v/v) de GA-1000, 0.1% (v/v) de vEGF, 0.1% (v/v) de R^3 -IGF-1, 0.1% (v/v) de hEGF et 0.4% (v/v) de hFGF-B (Clonetics, CAMBREX Biosciences, Emerainville, France). Le volume de milieu additionné dans la chambre supérieure est de 300 μl (insert) et de 700 μl dans la chambre inférieure (puits). Le milieu est changé tous les 2 jours. La croissance cellulaire est évaluée en comptant le nombre de cellules avec le colorant bleu de Trypan. La résistance transendothéliale (TEER) est mesurée en utilisant le Millicel-ERS (Millicel, Millipore, St Quentin en Yvelines, France). La TEER est exprimée en $\text{Ohms} \cdot \text{cm}^2$ comme la différence entre la résistance mesurée en présence de cellule et la résistance mesurée avec un filtre sans cellules. La formation des jonctions serrées est évaluée par l'immunomarquage de la protéine ZO-1 (Zonula Occludens-1) (voir partie VI).

Les cellules Σ CFTE29₀- sont mises en culture au dos du filtre, préalablement prétraité avec le mélange fibronectine/collagène I/SAB à raison de 1.10^5 cellules pendant 4 h à 37°C le temps de leur fixation. Le milieu de culture est du MEM (Life Technologies Gibco, Renfrewshire, UK) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco) non décomplémenté, avec 2 mM de L-glutamine et des antibiotiques (100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine, Gibco). Après les 4 h de fixation, les filtres sont retournés et le milieu de culture est additionné à raison de 300 µl dans la chambre supérieure et de 700 µl dans la chambre inférieure.

IV] LA FORMATION DES POLYPLEXES.

Les polyplexes ADNp/pLK-His (rapport massique 1/3, rapport azote/phosphate N/P de 2.7) sont formés en ajoutant 15 µg de pLK-His dans 30 µl HEPES 10 mM pH 7.4 à la solution de plasmide (5 µg d'ADNp dans 70 µl HEPES 10 mM pH 7.4). Après 30 min à température ambiante, les polyplexes sont repris dans un volume voulu de milieu OptiMEM contenant 10% de SVF.

Les polyplexes ADNp/jetPEITM sont formés en ajoutant 10 µl de jetPEITM (7.5 mM) dans 50 µl de glucose 5% à la solution de plasmide (5 µg d'ADNp dans 45 µl de glucose 5%) pour un rapport N/P de 5. Après 30 min à température ambiante, les polyplexes sont repris dans un volume voulu de milieu OptiMEM contenant 10% de SVF.

Les polyplexes fluorescents (pSV2luc-YOYO et pSV2luc-fitc) et non fluorescents sont formés de la même façon.

La taille et la charge des polyplexes sont déterminées en utilisant le ZetaSizer 3000 (Malvern Instruments, Orsay, France) comme décrit dans Bello Roufai et Midoux, 2001.

VI] CYTOMETRIE EN FLUX.

Les études d'internalisation des polyplexes marqués avec le YOYO-1 ont été réalisées en utilisant une méthode de cytométrie en flux.

Les études d'internalisation des polyplexes marqués avec le YOYO-1 ne nécessite pas l'utilisation de la monensine. Le YOYO-1 n'est pas sensible au pH environnant.

Après l'internalisation, les cellules sont lavées avec du PBS, décollées par traitement au PET (PBS avec 0,02% d'EDTA et 2,5 µg/ml de trypsine), centrifugées (1500 rpm pendant 5 min à 4°C) et suspendues dans du PBS contenant 15.2 nM de NaF et 0.2% de 2-phenoxyethanol. La fluorescence est mesurée par cytométrie en flux avec le cytomètre FACSsort (Becton Dickinson, Grenoble, France). La fluorescence est enregistrée à 520 nm après excitation à 488 nm et est exprimée comme la valeur moyenne de l'intensité de fluorescence de 10 000 cellules.

VII] MICROSCOPIE CONFOCALE.

Les cellules sont lavées au PBS et fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 30 min à température ambiante. Elles sont ensuite lavées au PBS et perméabilisées avec du Triton X-100 1% dans du PBS pendant 15 min à température ambiante. Les cellules sont alors incubées 1 h à température ambiante avec un anticorps polyclonal de lapin anti-ZO-1 à 1/100 dans du PBS, contenant 1% de SAB (Zymed, San Francisco, USA). Après 3 lavages avec du PBS contenant 0.5% de SAB, les cellules sont incubées 1 h avec un anticorps

polyclonal Ig de chèvre anti-lapin marqué au FITC dilué au 1/100 dans du PBS, contenant 1% de SAB (Zymed, San Francisco, USA). Les cellules sont rincées avec du PBS, montées sur lame avec du Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) et observées au microscope confocal de fluorescence (Bio-Rad MRC 1024, Oxfordshire, Angleterre). Les images obtenues sont ensuite traitées avec le programme Adobe Photoshop 6.0.

VIII] VIDEO-MICROSCOPIE EN CONDITION DE FLUX.

A] Culture des cellules HLMEC et mise en place du système de flux.

Les cellules HLMEC sontensemencées à raison de 2.10^5 cellules sur des lames de culture cellulaire (NUNC Brand, Nudge Nunc International, Rochester, NY, USA). Les lames sont préalablement incubées pendant 20 min à 37°C avec du MEM contenant de la fibronectine (0,01 mg/ml), du collagène I (0,03 mg/ml) et de la sérum albumine bovine (0,1 mg/ml, SAB). Après 72 h de culture, les cellules forment une monocouche de cellules polarisées. Les lames sont ensuite montées dans la chambre de flux (CAF-10, Immunetics, Boston, MA, USA) et le vide est obtenu par une pompe à vide. La sortie de la chambre est connectée à une pompe (modèle PHD 2000, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA) pour contrôler le flux à travers la chambre du milieu avec ou sans polyplexes. L'entrée de la chambre est connectée au réservoir contenant le milieu avec ou sans polyplexes via une valve trois voies.

Le flux (Q) requis pour donner la contrainte de cisaillement (wall shear-stress) τ désirée est calculé à partir des dimensions de la chambre de flux et de la viscosité du milieu suivant :

$Q = (\tau w.h^2) / 6\mu$ où μ est la viscosité du milieu exprimée en dyn-s/cm², w la largeur interne de la chambre de flux exprimée en cm et h la hauteur interne de la chambre de flux exprimée en cm, τ la contrainte de cisaillement exprimée en dyn/cm², Q le flux exprimé en cm³/s.

Les monocouches sont d'abord perfusées avec du milieu sans polyplexes pendant 10 min pour remplir le système puis avec le milieu avec polyplexes.

B] Acquisition et analyse des images.

La fixation des polyplexes sur la monocouche de cellules endothéliales est observée sous un microscope inversé Axiovert 200M (Zeiss, Le Pecq, France) en utilisant l'objectif Plan-NeoFluar 10X/0.30 Ph1 (DIC I). Le microscope est connecté via une camera AxioCam MRm (Zeiss, Le Pecq, France) à l'ordinateur.

L'acquisition se fait avec le logiciel AxioVision 4.3. Une série d'acquisitions en z se fait toutes les 30 secondes pendant 30 min. Les images sont ensuite analysées avec le logiciel Visilog 6.3. Les deux premières images et les deux dernières sont sommées donnant ainsi une image des polyplexes au temps $t = 0$ et $t = 30$ min. L'image sommée à $t = 0$ est soustraite de l'image sommée à $t = 30$ min pour donner une image de l'ensemble des polyplexes fixés pendant 30 min dans les conditions de flux.

VIII] ETUDE DU PASSAGE TRANSENDOTHELIAL DES POLYPLEXES.

5 µg d'ADN-YOYO complexé aux vecteurs PEI et pLK-His sont incubés dans un insert pendant 4 h, 6 h ou 12 h. L'insert contient ou ne contient pas une monocouche de cellules HLMEC. Après l'incubation, les milieux dans l'insert et dans le puits sont récupérés et leur fluorescence est enregistrée à 535 nm après excitation à 485 nm au spectrofluorimètre VICTOR™ 1420 (PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Boston, MA, USA). Les pourcentages de polyplexes dans l'insert et dans le puits sont calculés par rapport à la quantité totale de polyplexes introduits dans l'insert.

Pour déterminer l'état de condensation des polyplexes, les milieux récupérés sont concentrés au SpeedVac (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlande) puis les polyplexes sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 0,6 % (Promega, Madison, WI, USA).

L'état de condensation des polyplexes est mesuré par fluorescence (excitation 490 nm ; émission 520 nm) en présence de SYBER® Green I (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) et d'un excès de sulfate de dextran (260 µg/ml) d'un poids moléculaire de 500 000 Da (Sigma, St Louis, MO, USA). Lors de la dissociation de l'ADN avec le polymère par le sulfate de dextran, un polymère anionique, le SYBER® Green I de la solution va s'intercaler entre les bases de l'ADN et émettre une fluorescence. L'intensité de fluorescence sera proportionnelle à la dissociation des complexes.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

CHAPITRE I:

INFLUENCE DE LA POLARISATION CELLULAIRE SUR L'INTERNALISATION ET L'EFFICACITE DE TRANSFECTION DES POLYPLEXES.

A| Introduction.

Lors d'une administration systémique, les polyplexes sont introduits dans la circulation sanguine et doivent atteindre les cellules cibles dans les organes. Ces polyplexes doivent donc être capables d'interagir avec les cellules endothéliales et de traverser le système vasculaire.

Pour aborder ces études, nous avons mis au point, pour la première fois, un système intégré d'endothélium pulmonaire en utilisant des cellules endothéliales des microvaisseaux du poumon (HLMEC). Ces cellules sont cultivées sur un filtre poreux et à confluence, elles se polarisent. La polarisation cellulaire implique la formation de jonctions intercellulaires séparant ainsi les domaines membranaires apical et basolatéral qui ont des compositions lipidiques et protéiques différentes. Cette polarisation assure le contrôle de la perméabilité de la monocouche de cellules reflétant l'état physiologique de l'endothélium microvasculaire. Dans le sang, les polyplexes entrent en contact avec l'endothélium vasculaire par le côté apical. Les interactions des polyplexes avec les cellules endothéliales, leur endocytose et leur efficacité de transfection peuvent donc dépendre de cet état.

Pour ces raisons, nous avons comparé l'internalisation et l'efficacité de transfection de polyplexes formés avec la polylysine histidylée et la polyéthylèneimine, à la fois avec des cellules HLMEC non polarisées et polarisées. Nous avons également comparé les efficacités de ces deux vecteurs sur des cellules épithéliales des voies aériennes déficientes pour le gène CF polarisées et non polarisées. L'internalisation des polyplexes dans les cellules a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant un plasmide fluorescent.

B| Publication: Mennesson *et al.*, 2005.

Les résultats de cette étude sont reportés dans l'article ci-dessous intitulé:
" Transfection efficiency and uptake process of polyplexes in human lung endothelial cells: a comparative study in non-polarized and polarized cells ", Mennesson *et al.*, *J Gene Med.*, 2005, 7: 729-738.

Transfection efficiency and uptake process of polyplexes in human lung endothelial cells: a comparative study in non-polarized and polarized cells

Eric Mennesson¹
Patrick Erbacher²
Véronique Piller¹
Claudine Kieda¹
Patrick Midoux¹
Chantal Pichon^{1*}

¹Centre de Biophysique Moléculaire UPR4301 CNRS affiliated to the University of Orléans and INSERM, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2, France

²Polyplus-Transfection SAS, BIOPARC, BP90018, 67401 Illkirch, France

*Correspondence to:
Chantal Pichon, Centre de Biophysique Moléculaire UPR4301 CNRS affiliated to the University of Orléans and INSERM, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2, France.
E-mail: pichon@cnrs-orleans.fr

Received: 30 September 2004

Revised: 9 November 2004

Accepted: 10 November 2004

Abstract

Background Following systemic administration, polyplexes must cross the endothelium barrier to deliver genes to the target cells underneath. To design an efficient gene delivery system into lung epithelium, we evaluated capture and transfection efficiencies of DNA complexed with either Jet-PEI™ (PEI-polyplexes) or histidylated polylysine (His-polyplexes) in human lung microvascular endothelial cells (HLMEC) and tracheal epithelial cells.

Methods After optimizing growth conditions to obtain a tight HLMEC monolayer, we characterized uptake of polyplexes by flow cytometry and evaluated their transfection efficiency. Polyplexes were formulated as small particles. YOYO-labelled plasmid fluorescence intensity and luciferase activity were used as readouts for uptake and gene expression, respectively.

Results PEI-polyplexes were more efficiently taken up than His-polyplexes by both non-polarized (2-fold) and polarized HLMEC (10-fold). They were mainly internalized by a clathrin-dependent pathway whatever the cell state. In non-polarized cells, His-polyplexes entered also mainly via a clathrin-dependent pathway but with an involvement of cholesterol. The cell polarization decreased this way and a clathrin-independent pathway became predominant. PEI-polyplexes transfected more efficiently HLMEC than His-polyplexes (10^7 vs. 10^5 relative light units (RLU)/mg of proteins) with a more pronounced difference in polarized cells. In contrast, no negative effect of the cell polarization was observed with tracheal epithelial cells in which both polyplexes had comparable efficiency.

Conclusions We show that the efficiency of polyplex uptake by HLMEC and their internalization mechanism are polymer-dependent. By contrast with His-polyplexes, the HLMEC polarization has little influence on the uptake process and on the transfection efficiency of PEI-polyplexes. Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords gene transfer; non-viral vectors; cationic polymers; polyethylenimine; histidine; polylysine; endothelial cells

Introduction

Clinical development of gene therapy requires the introduction of genes into target cells which has been achieved using synthetic vehicles of high safety,

low immunogenicity and ease of manufacture [1–3]. Taking advantage of DNA self-assembly with a cationic polymer such as polylysine or polyethylenimine to condense a plasmid DNA like the viral genome in viral particles, such electrostatic complexes (termed polyplexes) are prospected for the design of synthetic gene delivery systems that incorporate viral-like features for efficient transfection. In a systemic administration, polyplexes, which are introduced into the body intravenously, are confronted with the blood circulation and must reach the target cells located in organs. Consequently, polyplexes must cross endothelial layers from the vascular compartment to the interstitial space. The vascular endothelium is composed of endothelial cells (EC), which are able not only to select specific blood-borne cells and molecules, but also to transport them towards the tissue underneath. It is known that EC from blood vessels of different organs exhibit differences including various selection criteria for cells and molecules that are allowed to cross the endothelial barrier [4]. Thus, these cells function as gatekeepers controlling the infiltration of specific cells or macromolecules into the vessel wall. EC are particularly interesting due to their direct contact with the bloodstream and their involvement in a number of normal and pathologic conditions; they are potential targets for gene therapy in such conditions as ischemic cardiovascular diseases [5–7].

In recent years, some reports concerning the transfection efficiency of EC with non-viral systems have been published [8–13]. They pointed out the intrinsic resistance of EC to transfection by the majority of non-viral systems. However, an efficient transfection of primary EC using polyethylenimine (L-PEI) has been recently reported [8,14]. As yet most of these studies have been conducted on sparse/subconfluent human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), a cell condition which can be observed during tumour vascularization for example. *In vitro* confluence, under which the cell growth is contact-inhibited and the cells are polarized with a complete control of permeability, reflects the physiological state of a vascular endothelium. Indeed, the cell polarization involves the formation of two specialized cellular domains with distinct protein and lipid compositions. The apical side confronts the blood circulation and the basal side faces the basement membrane of the vascular endothelium. Tight junctions constitute fences that prevent not only the mixing of the apical and the basal membrane components, but also work as barriers between neighbouring cells. So, it is obvious that polarized and non-polarized cells exhibit different features, which may modify their transfection efficiency by polyplexes. As an example, molecules from the blood stream are taken up only from the apical membrane of polarized cells while such membrane compartmentalization does not exist in non-polarized cells. Consequently, interactions of polyplexes with EC, their endocytosis and intracellular trafficking may be dependent on cell polarization.

Here, we report a comparative study of the transfection efficiency of human lung EC by using two cationic

polymers: linear polyethylenimine (L-PEI) [15–17] and histidylated polylysine (His-pLK) [18]. Besides their DNA-condensing capacity, these cationic polymers exhibit a membrane destabilization property in an acidic milieu allowing endosomal escape of pDNA. First, we describe growth conditions to obtain a tight monolayer of polarized human lung microvascular endothelial cells (HLMEC) mimicking the endothelium lining of the lung blood vessel. Then, we characterize the uptake mechanisms and evaluate the transfection efficiency of PEI-polyplexes and His-polyplexes both in polarized and non-polarized cells. Together, our data indicate that both the endocytosis process and the transfection efficiency vary depending on the polarization state of the cells and on the nature of the polyplexes.

Materials and methods

Materials

All reagents were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France) unless stated otherwise.

Cells and cells culture

The human lung microvascular endothelial cells (HLMEC) were immortalized HS888Lu cells (ATCC CCL211, ATCC Rockville, MD, USA) from normal lung tissue of a patient with osteosarcoma metastasis to the lung [19]. Cells (10^5) were plated on a tissue culture dish and grown in 10 ml OptiMEM (Life Technologies Gibco, Renfrewshire, UK) supplemented with 2% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. On day 5, cells were harvested by treating with trypsin (phosphate-buffered saline (PBS) with 0.02% (w/v) EDTA and 2.5 µg/ml trypsin) at 37 °C for 10 min. Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere in the presence of 5% CO₂.

The immortalized human tracheal epithelial cell line (ΣCFTE290- cells) was from a CF patient homozygous for the ΔF508 mutation and was kindly given by Dr D. C. Gruenert (University of Vermont, Burlington, VT, USA) [20]. Five hundred thousand cells were plated on tissue culture plasticware (75 cm²) coated with fibronectin (0.01 mg/ml), collagen (0.03 mg/ml), and bovine serum albumin (BSA) (0.1 mg/ml) contained in minimum essential medium (MEM) and grown in 20 ml MEM (Life Technologies Gibco, Renfrewshire, UK) supplemented with 10% non-heat-inactivated FBS (Gibco), 2 mM L-glutamax (Gibco) and antibiotics (100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, Gibco). The culture medium was changed every 2 days. On day 8, cells were harvested by treatment with trypsin at 37 °C for 10 min.

Cells were free from mycoplasma as evidenced by bisbenzimidazole staining [21].

Polarized cell culture

A HLMEC monolayer was obtained by seeding 5×10^4 cells on a cell culture insert incorporating a poly(ethylene terephthalate) (PET) track-etched membrane with 3 μm pore size and 8×10^5 pores/ cm^2 (PET Falcon, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Cells were grown in EBM-2 supplemented with 5% FBS, 0.1% ascorbic acid, 0.04% hydrocortisone, 0.1% GA-1000, 0.1% vEGF, 0.1% R³-IGF-1, 0.1% hEGF, and 0.4% hFGF-B (Clonetics, CAMBREX Biosciences, Emerainville, France). The volumes of medium added in the upper chamber and in the lower chamber were 0.3 and 0.7 ml, respectively. The media in the upper and lower chambers were changed every 2 days. Cell growth was evaluated by counting the cell number using Trypan blue vital colorant. The transendothelial electrical resistance (TEER) was measured using a Millicel-ERS (Millicel, Millipore, St Quentin en Yvelines, France). ZO-1 (Zonula Occludens-1) immunostaining was performed as followed: cells were gently washed with PBS, fixed for 30 min at room temperature with 4% *p*-formaldehyde in PBS and permeabilized with 1% Triton X-100 in PBS for 15 min at room temperature. Then, cells were incubated for 1 h at room temperature with a rabbit polyclonal anti-ZO-1 antibody diluted 1/100 in PBS containing 1% BSA (Zymed, San Francisco, USA). After washing three times with PBS containing 0.5% BSA, cells were incubated with a FITC-labelled goat polyclonal anti-rabbit Ig antibody (Zymed, San Francisco, CA, USA) diluted 1/100 in PBS containing 1% BSA. Cells were rinsed twice with PBS, mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) and analyzed with a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica, Heidelberg GmbH, Germany). Images were processed with Adobe Photoshop 6.0 software.

Σ CFTE290- cells were grown as monolayers on the underside of 3- μm pore PET filter inserts. First, one side of the filter insert was coated with fibronectin, collagen, and BSA in MEM for 20 min at 37 °C. Then, cells (10^5 cells in 50 μl of Σ CFTE290- medium) were seeded on this side. After 4 h at 37 °C in a humid CO₂ incubator, the filter inserts were placed in the wells of the custer plate. The volumes of medium added in the upper chamber and in the lower chamber were 0.3 and 0.7 ml, respectively. Cell culture conditions were performed as described above for HLMEC monolayers. TEER was also used as a functional measurement reflecting tight junction formation. Monolayers were used when they reached a maximum TEER of $\sim 200 \text{ Ohms.cm}^2$ (after 4–5 days of culture).

Plasmid and cationic polymers

pUT650 (5.15 kb, Cayla, Toulouse, France) and pSV2Luc (5 kb) [22] were expression plasmids encoding the firefly luciferase gene under control of the promoter of the

human cytomegalovirus and of the simian virus-40 large T antigen, respectively.

pSV2Luc was labelled with YOYO-1 (491/509, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). The *bis*-intercalating molecule was added at a ratio of one dye for 300 base pairs. The mixture was dialyzed overnight at 4 °C. The fluorescent plasmid was used for flow cytometry and confocal microscopy studies.

Histidylated polylysine (His-pLK, Mw = 70 400), prepared as previously described [23], was a polylysine of 190 lysyl residues with 50% of them substituted with histidyl residues. Polyethylenimine (Jet-PEITM), a linear cationic polymer, was from Polyplus-Transfection SAS (Illkirch, France).

Preparation of polyplexes

Polyplexes were prepared by adding 15 μg of His-pLK in 30 μl of 10 mM HEPES buffer, pH 7.4, to 5 μg plasmid in 70 μl of 10 mM HEPES buffer, pH 7.4, in a optimized polymer/DNA weight ratio of 3 : 1 (a negative-to-positive charge ratio, N/P, of 2.7). The solution was mixed for 4 s and allowed to stand for 30 min at 20 °C. It was adjusted to the required volume with OptiMEM supplemented with 10% FBS before transfection.

PEI-polyplexes were prepared by adding 10 μl Jet-PEITM (7.5 nM nitrogen) solution in 50 μl H₂O containing 5% glucose to 5 μg plasmid in 45 μl H₂O, 5% glucose in an optimized polymer/DNA weight ratio of 2 : 1 (N/P ratio of 5). The solution was mixed for 4 s and allowed to stand for 30 min at 20 °C. It was adjusted to the required volume with OptiMEM supplemented with 10% FBS before transfection.

Fluorescent polyplexes were prepared with YOYO-1 labelled pSV2Luc.

The size and the charge of the polyplexes were determined using a ZetaSizer 3000 (Malvern Instruments, Orsay, France) as described [24].

Uptake of polyplexes by HLMEC

Non-polarized and polarized cells (at the same cell density) were incubated with YOYO-1-labelled pSV2Luc complexed with L-PEI or His-pLK for the indicated time and temperature. When indicated, cells were pretreated for 30 min at 37 °C with either filipin III (5 $\mu\text{g/ml}$), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (1 μM), cytochalasin D (1 $\mu\text{g/ml}$) or in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 0.5 M sucrose (hypertonic treatment) before transfection. These conditions were maintained during the incubation with polyplexes. For experiments with cell monolayers, 300 μl of polyplexes were added in the upper chamber. Cells were washed with PBS, harvested by trypsin, centrifuged (1500 rpm for 5 min at 4 °C) and suspended in PBS containing 15.2 nM NaF and 0.2% 2-phenoxyethanol. The fluorescence intensity of the cells was measured by flow

cytometry using a FACSort cytometer (Becton Dickinson, Grenoble, France). The fluorescence was recorded at 520 nm after excitation at 488 nm and was expressed as the mean value of the fluorescence intensity for 10 000 cells.

For actin microfilament staining, cells were labelled for 20 min at room temperature with Alexa Fluor 568 Phalloidin (stock solution: 200 units/ml in methanol, Molecular Probes) diluted 1/1000 in PBS containing 1% BSA. Then, cells were washed three times with PBS and mounted in Vectashield as described above.

Transfection efficiency

Non-polarized and polarized cells (at the same cell density) were incubated for 4 h at 37 °C with pUT650 complexed with L-PEI or His-pLK. Then, the transfection medium was replaced with fresh culture medium and cells were cultured for 24 h at 37 °C. The luciferase activity in cell lysates was measured by chemiluminescence with a luminometer (LUMAT LB 9501; Berthold, Wildbach, Germany) as described [23]. The amount of proteins per sample was determined by using the bicinchoninic acid colorimetric assay as described [23].

Results

The human lung microvascular endothelial cell line, HLMEC, has been established as a tool to assess the molecular basis of lung endothelium selectivity [19]. These cells express specific markers of endothelial cells such as the von Willebrand factor (vWf), angiotensin-converting enzyme (ACE) and adhesion molecules including VE-cadherin, CD62E and CD29 (β 1 integrin). They have preserved the phenotypic characteristics related to their tissue of origin. Therefore, HLMEC can be used as an *in vitro* cellular model to mimic a lung microvascular endothelium barrier allowing investigations of the capture of polyplexes and their transfection efficiency.

Establishment of EC monolayers

First, we optimized culture conditions to obtain a confluent HLMEC monolayer on PET insert filters. The transendothelial electrical resistance (TEER) of the monolayer was the first parameter that we used to measure the monolayer integrity in the model. We found that after 3 days of culture, the TEER and the cell number reached a plateau at 250 Ohms.cm² and about 7×10^5 cells, respectively (Figure 1A). As a second parameter, we checked that the tight junction formation was achieved by immunocytochemical detection of tight-junction-associated proteins comprising ZO-1 (Figures 1B and 1C), VE-cadherin and occludin (not shown). As observed in Figures 1B and 1C, ZO-1 staining outlined

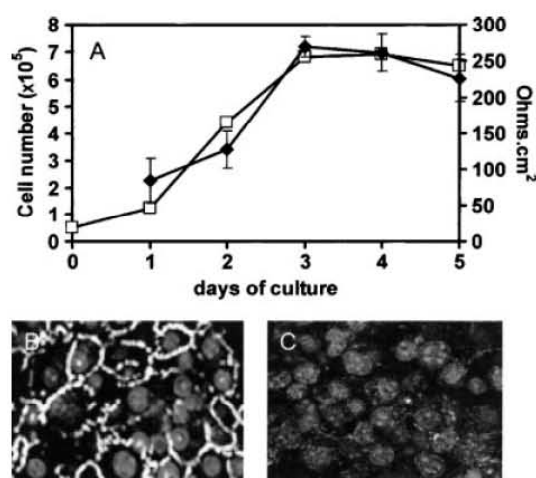


Figure 1. Formation of a confluent HLMEC monolayer. Cells were seeded at 1.5×10^5 per cm² on a PET Falcon insert with 3 μ m pore size in EBM-2 medium containing 5% FBS. (A) Cell growth (\square) and transendothelial electrical resistance (\blacksquare). (B) Tight junction formation was assessed by immunostaining of ZO-1 protein. Horizontal section. The cell nuclei were labelled with TOTO. (C) Immunostaining control with secondary antibody

the cells and was localized at the tight junctions. The functional activity of these junctions, indicated by the tightness of the monolayer, can be also evaluated by the permeation of FITC-dextran (4 kDa). After 2 h incubation at 37 °C, less than 0.5% of the fluorescence input was found in the lower chamber (data not shown).

Influence of the cell polarization on the uptake of polyplexes

We compared the uptake of a plasmid complexed with two cationic polymers, His-pLK and L-PEI, in non-polarized cells vs. polarized cells. These polyplexes suspended in complete OptiMEM exhibited a mean size of 250–300 nm and the zeta potential ranged from –5 to –13 mV. To make a relevant comparison, experiments with non-polarized cells were performed with 7×10^5 cells, the cell number reached when a confluent monolayer was obtained. Cells were incubated for 2 h at 4 °C or 37 °C with different amounts of YOYO-labelled plasmid condensed with either His-pLK or L-PEI. After incubation of HLMEC with polyplexes, we washed the cells extensively and harvested them with trypsin. We found that trypsin treatment did remove some but not all polyplexes bound to the cell surface especially for PEI-polyplexes as already reported [25]. Therefore, the uptake of pDNA was determined by flow cytometry from the value of the fluorescence intensity of cells incubated at 37 °C minus that of cells incubated at 4 °C. As shown in Figure 2A, the uptake of pDNA with L-PEI or His-pLK increased with the amount of pDNA. There was no saturation up

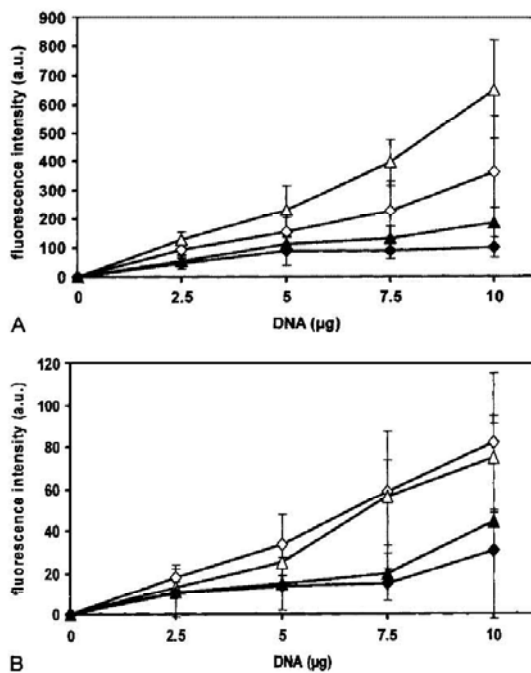


Figure 2. Uptake of pDNA complexed with His-pLK or L-PEI. (A) Non-polarized (white symbols) and polarized (black symbols) HLMEC were incubated for 2 h at either 37°C or 4°C with various amounts of YOYO-labelled pDNA complexed with His-pLK (◇, ◆) or L-PEI (△, ▲). The fluorescence intensity of the cells was measured by flow cytometry. The uptake of pDNA was determined from the fluorescence intensity of cells incubated at 37°C minus that of cells incubated at 4°C. (B) Cells were incubated at 4°C as above except that they were detached by gentle scraping

to 10 µg pDNA in non-polarized cells whereas a plateau was observed at 5 µg pDNA when cells were polarized. Moreover, the uptake of pDNA with L-PEI and His-pLK was more important (2–4-fold) in non-polarized cells than in polarized ones. These data suggest that the cell polarization modifies the uptake of the polyplexes. It can also be noticed that PEI-polyplexes were 2-fold more internalized than His-polyplexes in non-polarized as well as in polarized cells despite their similar binding on the plasma membrane (Figure 2B). Consequently, the differential uptake of these polyplexes exhibiting similar size and charge did not result from a higher binding on the cell surface.

A kinetic analysis of the uptake was performed over 6 h with 5 µg pDNA (Figure 3). During the first hour of incubation, a moderate uptake of the plasmid with both polymers occurred in non-polarized and in polarized cells. After this period, the pDNA internalization with L-PEI was time-dependent in both confluent and non-confluent cells. The sharp increase observed after 4 h incubation suggests a pDNA intracellular accumulation. The pDNA complexed with His-pLK was hardly endocytosed at all by polarized cells. After 6 h incubation, polarized cells took up 10

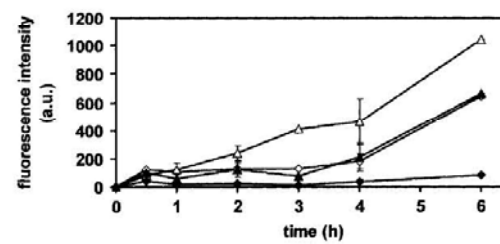


Figure 3. Kinetics of the uptake of pDNA complexed with His-pLK or L-PEI. Non-polarized (white symbols) and polarized (black symbols) HLMEC were incubated for indicated times at either 4°C or 37°C with 5 µg of YOYO-labelled pDNA complexed with His-pLK (◇, ◆) or L-PEI (△, ▲). Cell fluorescence intensity was measured by flow cytometry. The uptake of pDNA was determined as detailed in Figure 2

times less DNA than non-polarized ones. In contrast to PEI-polyplexes, the establishment of cell polarity modified strongly the uptake kinetics of His-polyplexes. Overall, these data indicate that the uptake of pDNA by polarized cells was strongly reduced in the presence of His-pLK as compared to L-PEI.

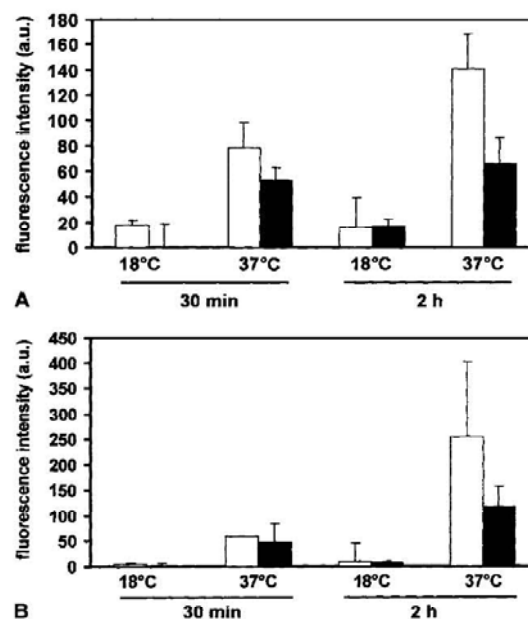


Figure 4. Effect of the temperature on the uptake of pDNA complexed with His-pLK or L-PEI. Non-polarized (white bars) and polarized (black bars) HLMEC were incubated for the indicated time either at 4°C, 18°C or 37°C with 5 µg of YOYO-labelled pDNA complexed with His-pLK (A) or L-PEI (B). The uptake of pDNA was determined from the fluorescence intensity of cells incubated at 37°C or 18°C minus that of cells incubated at 4°C

The endocytosis pathways of polyplexes

To investigate the uptake pathway of these two types of polyplexes, we studied the effects of temperature and specific treatments known to act on different endocytosis mechanisms. It is worth noting that the integrity of the cell monolayer was always checked upon these cell treatments.

The uptake of plasmid decreased drastically at 18 °C whatever the polarization state of the cell (Figure 4).

The inhibition was 70–87% with His-pLK and 84–97% with L-PEI for polarized and non-polarized cells, respectively. Thus, these polyplexes are probably taken up by an endocytosis process which is known to be highly temperature-dependent and which is dramatically reduced at 18 °C.

Then, we treated cells with a hypertonic medium that inhibits clathrin-dependent endocytosis by breaking up clathrin-coated pits. Again, this treatment significantly decreased the uptake of both polyplexes whatever the polarization state, indicating a clathrin-dependent uptake

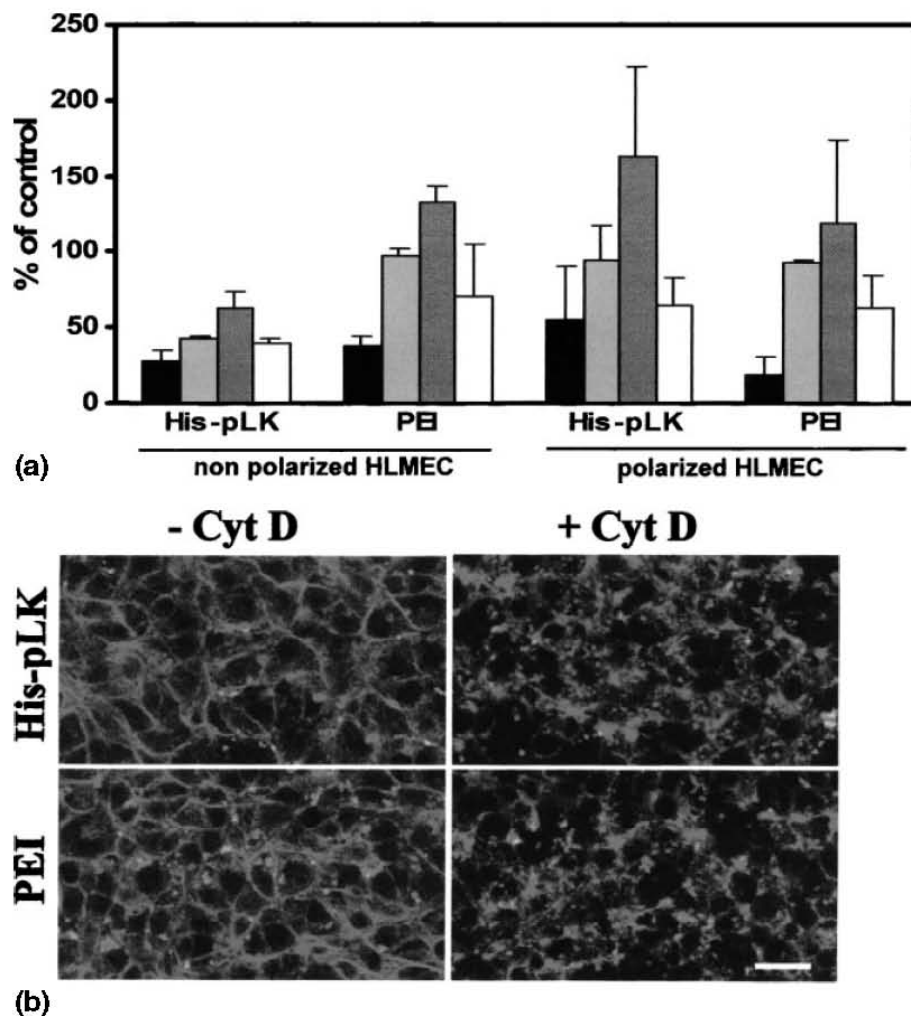


Figure 5. (A) Influence of endocytotic inhibitors on the uptake of pDNA complexed with His-pLK or L-PEI. Non-polarized and polarized HLMEC were pretreated as described in 'Material and methods' with either a hypertonic medium (black bars), filipin III (grey bars), CytD (hatched bars) or PMA (white bars). Then, cells were incubated for 2 h at 4 °C or 37 °C with 5 µg of YOYO-labelled pDNA complexed with His-pLK or L-PEI. The fluorescence intensity of the cells was measured by flow cytometry. The uptake of pDNA was determined as described in Figure 2. It was expressed as percent (% of control) of the uptake by untreated cells. (B) Actin microfilament organization. The HLMEC monolayer was pretreated (+ CytD) or not (- CytD) for 30 min at 37 °C with CytD and incubated for 2 h at 37 °C with 5 µg of YOYO-labelled pDNA complexed with His-pLK or L-PEI. Cells were fixed and actin microfilaments were stained with Alexa Fluor 568 labelled phalloidin. Images shown correspond to the merge of green (polyplexes) and red (actin microfilaments) images obtained from confocal microscopy analysis. Scale bar: 10 µm

mechanism (Figure 5A). The uptake of pDNA condensed with L-PEI was inhibited by $63 \pm 6\%$ and $82 \pm 12\%$ in non-polarized and polarized cells, respectively. With His-pLK, it was less inhibited in polarized cells ($43 \pm 4\%$) than in non-polarized cells ($73 \pm 8\%$), suggesting that a clathrin-independent pathway occurs also in the former. Next, we used filipin III, a sterol-binding agent that removes cholesterol from the plasma membrane. Although filipin III is mainly known to block endocytosis via lipid rafts and caveolae, it can also perturb the cholesterol-mediated clathrin-dependent pathway [26]. As shown in Figure 5A, there was no effect of filipin III on the uptake of pDNA with L-PEI in both polarization states of the cells. By contrast, a significant uptake inhibition of pDNA with His-pLK ($58 \pm 2.5\%$) was found in non-polarized cells whilst no effect was seen in polarized cells (Figure 5A). This indicates that cholesterol was not involved in the uptake of pDNA with both polymers in polarized cells. Conversely, it was required for one part of the uptake of pDNA with His-pLK in non-polarized cells. Taking into account the inhibition extent of $\sim 70\%$ and $\sim 60\%$ upon hypertonic medium and filipin III treatment, respectively, the uptake of His-polyplexes in non-polarized cells could likely occur via a cholesterol-mediated clathrin-dependent pathway.

We wanted to check the effect of cytochalasin D (CytD), which destabilizes actin microfilaments, on the internalization of polyplexes in the function of the cell polarization (Figure 5A). CytD treatment induced a slight enhancement (20–30%) in the uptake of PEI-polyplexes in both non-polarized and polarized cells. However, the effect of this drug on His-polyplexes depended on the polarization state. The uptake decreased by 40% in non-polarized cells in the presence of CytD whereas it increased by 60% in polarized cells. The cytoskeleton is crucial for the maintenance of the endothelial integrity and the regulation of vascular permeability [27]. It has been reported that reorganization of filamentous actin by microfilament polymerization disrupting agents led to an increase in endocytosis activity of endothelial cells [28,29]. As shown in Figure 5B, the organization of actin microfilaments as filamentous dense bands at the cell periphery was modified by the $1 \mu\text{g/ml}$ CytD treatment. It is worth noting that no significant change in the TEER values of the cell monolayer occurred before and after the CytD treatment (266 ± 6 vs. $270 \pm 4 \text{ Ohms.cm}^2$). Others have already reported such observations [30].

Finally, the influence of PMA, a macropinocytosis (a clathrin-independent internalization pathway) activator, was assessed. PMA did not increase the uptake of two polyplexes in either polarization state indicative of the absence of polyplex macropinocytosis. The uptake with L-PEI was reduced by 30% in both polarization states whereas it decreased by 60% with His-pLK in non-polarized cells (Figure 5A). In EC, PMA is known to induce a profound actin rearrangement of stress fibers into a grid-like network, which may result in physiological alterations of the uptake mechanisms [29,31].

The transfection efficiency

The influence of the HLMEC polarization on the transfection efficiency with these two polyplexes was evaluated by using a luciferase-encoding plasmid and luciferase activity as a readout. As shown in Figure 6, the monolayer formation did not modify the transfection efficiency of PEI-polyplexes. The luciferase activity was DNA-concentration-dependent and reached a maximum with $5 \mu\text{g}$ of plasmid. These results, combined with the above uptake data, indicate that the 2-fold decrease in PEI-polyplex uptake by polarized cells has no significant influence on their transfection efficiency. By contrast, His-pLK did not trigger a very efficient transfection. Indeed, the luciferase activity was very weak (10^4 RLU/mg of protein) in polarized HLMEC. It was 10 to 100 times less efficient than in non-polarized cells. This could be due to the strong reduction of the uptake of His-polyplexes by polarized cells.

With the aim of exploiting our HLMEC monolayer to evaluate *in vitro* the capacity of transcytosed polyplexes to transfect the epithelial cells underneath, we looked for the transfection efficiency of His- and PEI-polyplexes into polarized cystic fibrosis human airway epithelial $\Sigma\text{CFTE29o-}$ cells (Figure 7). Polarized $\Sigma\text{CFTE29o-}$ cell monolayers were obtained by growing these cells on the underside of the PET filter insert as described in 'Material and methods'. Upon 4 days of culture, a tight monolayer

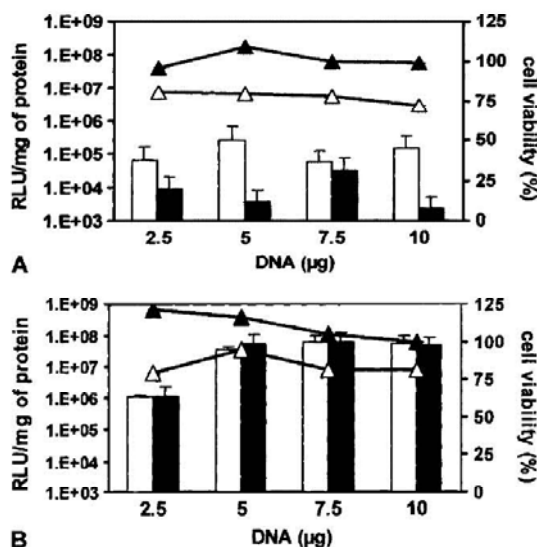


Figure 6. Transfection efficiency into HLMEC of pDNA complexed with His-pLK or L-PEI. Non-polarized (white bars and white symbols) and polarized (black bars and black symbols) HLMEC were incubated for 4 h with $5 \mu\text{g}$ of pUT650 plasmid complexed with His-pLK (A) or L-PEI (B). The medium was removed and cells were cultured for 24 h at 37°C in complete culture medium. The luciferase activity in cell lysates was measured by chemiluminescence and expressed as relative light units (RLU) per mg of protein. Cell viability was evaluated from the amount of protein in cell lysates

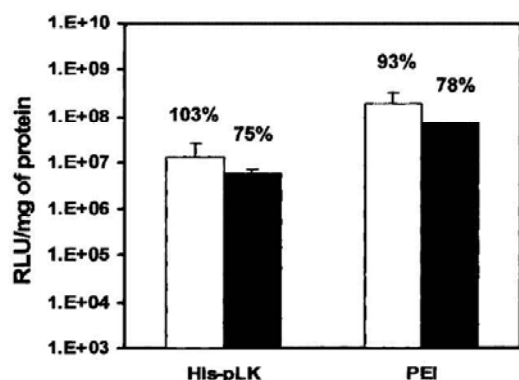


Figure 7. Transfection efficiency into Σ CFTE290- cells of pDNA complexed with His-pLK or L-PEI. Non-polarized (white bars) and polarized (black bars) Σ CFTE290- cells were incubated for 4 h with 5 μ g of pUT650 plasmid complexed with His-pLK or L-PEI. The medium was removed and the cells were cultured for 24 h at 37°C in complete culture medium. The luciferase activity in cell lysates was measured by chemiluminescence and expressed as relative light units (RLU) per mg of protein. Percentage corresponds to the cell viability evaluated from the amount of protein in cell lysates

was formed as assessed by the stabilization of TEER (200 Ohms.cm²). To mimic the physiological conditions, the transfection procedure was carried out by putting polyplexes in the insert filter in such a way that they were internalized through the basolateral side of the cell monolayer. In contrast to data obtained with HLMEC, we found that the transfection efficiency of Σ CFTE290-cells with both polyplexes did not greatly vary with the cell polarization (Figure 7). The transfection efficiency of PEI-polyplexes was as high as that obtained in HLMEC. That of His-pLK (~10⁷ RLU/mg of protein) was at least 2 orders of magnitude higher than the efficiency in HLMEC (less than 10⁵ RLU/mg of protein) and was close to that obtained with L-PEI.

Discussion

Following a systemic administration, the vascular endothelium is the first barrier encountered by polyplexes before reaching the target cells underneath and delivering the gene. The transfection efficiency of polymer-based systems has been mainly reported in the widely employed HUVEC, which were used in a non-polarized state. In the present study, human lung microvascular endothelial cells (HLMEC) were chosen as a cellular model of the endothelium because they are more relevant to deliver genes in pulmonary cells for the treatment of various diseases affecting the lung.

In accordance with the fact that the vascular endothelium is composed of polarized cells, the use of confluent monolayers is more appropriate for the investigation of the interactions of polyplexes with EC. After setting up the cell culture conditions of

HLMEC to obtain confluent and polarized monolayers, we compared the binding, uptake and transfection efficiency of polyplexes made with His-pLK and L-PEI in polarized and non-polarized EC. These cationic polymers can destabilize membranes in an acidic milieu and exhibit similar size and global charge.

Altogether, our uptake data indicate that the polarization of HLMEC affects their capacity to internalize a plasmid DNA complexed with these cationic polymers. Polarized cells exhibited a lower binding and uptake of both polyplexes that could be due to the decreased membrane fluidity of the apical membrane as well as the reduction of the plasma membrane surface that is accessible upon cell polarization. However, PEI-polyplexes were taken up at higher rates than His-polyplexes suggesting that the uptake mechanism of PEI-polyplexes is less susceptible to membrane rearrangement occurring during the establishment of cell polarity. By using clathrin-disrupting conditions, we found that internalization of PEI-polyplexes is mainly mediated by a clathrin-dependent mechanism whatever the polarization state of the cells. His-polyplexes enter non-polarized cells also mainly via a clathrin-dependent pathway. This internalization mechanism is reduced with cell polarization, as supported by the lower inhibition of the hypertonic treatment indicating that one part of His-polyplexes is internalized via a clathrin-independent pathway. It is tempting to speculate that the decrease of polyplex entry through clathrin-coated pits could contribute for a large part to their very low uptake.

In non-polarized cells, the uptake of His-polyplexes is partly inhibited in the presence of filipin III indicating that cholesterol is required for their internalization. The clathrin disruption and the cholesterol depletion inducing a comparable rate of uptake inhibition (70 ± 8% and 60 ± 2%, respectively) suggest that cholesterol is involved in this clathrin-dependent endocytosis. Such a peculiar routing has been recently reported for the uptake of lipopolyplexes in CHO cells [32]. This involvement of cholesterol could be triggered by the presence of hydrophobic histidine clusters on the surface of polyplexes when the imidazole groups are not protonated. By contrast, the clathrin-dependent internalization of PEI-polyplexes, which was not altered by filipin III, seemed to be cholesterol-independent. This type of entry was different from that reported recently by Kopatz *et al.* [33]. Indeed, it has been shown in HeLa cells that PEI-polyplexes are clustered into cholesterol-rich rafts via interaction with proteoglycan (syndecan) molecules. This discrepancy can be ascribed to the difference between the cell type used and especially to the sizes of the polyplexes. In Kopatz's study, PEI-polyplexes were formed in 150 mM NaCl, conditions known to generate large particles (~1 μ m). By contrast, in the present study, small particles were obtained by formulating PEI polyplexes in the absence of salt. Taken together, these data show that: (i) the uptake rate and the internalization pathway of these two kinds of polyplexes are different in non-polarized HLMEC, and (ii) the endocytosis process of

His-polyplexes is affected after establishment of the cell monolayer and switches to a predominant (60%) clathrin-independent pathway. This latter can include phagocytosis, macropinocytosis, caveolea- and lipid-raft-mediated endocytosis. Macropinocytosis was unlikely to be involved because no enhancement of pDNA uptake was induced by PMA. Interactions with lipid-enriched domains, also referred to as lipid rafts, have been found to be involved in interactions of His-polyplexes with the plasma membrane of HepG2 cells (our unpublished observations). It is worthy of note that, during cell polarization, the lipid distribution on the plasma membrane of HLMEC could be modified. Indeed, it was shown in brain capillary endothelial cells that the apical membrane was enriched with phosphatidylcholine whereas the basal membrane contained more sphingomyelin and glucosylceramide [34]. These latter lipids in association with cholesterol are part of lipid rafts [35,36]. The cholesterol level of the apical membrane may therefore be reduced. If a similar lipid sorting occurred during HLMEC polarization, one would expect a decrease in His-polyplex uptake. As a consequence, the uptake of His-polyplexes, which occurs via a cholesterol-mediated clathrin-dependent pathway, would be dramatically reduced in polarized HLMEC as compared to non-polarized cells. The data presented here largely fit this hypothesis.

In polarized HLMEC, PEI-polyplexes were as efficiently transfected as in non-polarized HLMEC. This can be ascribed to their uptake by a clathrin-dependent pathway, which was not modified upon cell polarization. The transfection efficiency of His-polyplexes in non-polarized cells was lower than with PEI-polyplexes. This probably stems from the fact that in a general fashion they were less taken up by HLMEC. This gap is increased in polarized cells where the uptake of plasmid was much lower and clathrin-mediated endocytosis was highly reduced. Recently, we have reported that His-polyplexes enter human hepatocarcinoma (HepG2) cells by clathrin-dependent and -independent pathways [37]. However, only the clathrin-dependent way is productive to induce an efficient transfection. The routing of His-polyplexes through a clathrin-independent mechanism may lead them to non-acidic vesicles where the escape of the plasmid to the cytosol cannot occur via membrane destabilization induced by the protonation of histidine residues.

This HLMEC monolayer is a relevant model of the vascular endothelium to study and to design polyplexes that can specifically deliver genes into the cells underneath, usually epithelial cells, which are also polarized. A particular application would concern diseases like cystic fibrosis and gene delivery by systemic application. Although the mucus barrier and tight junctions can be overcome by intravenous administration, one has to face the vascular endothelium barrier. Polyplexes must cross this barrier and reach the target polarized epithelial cells underneath. For this reason, we evaluated the transfection efficiency of these polyplexes in cystic fibrosis human airway epithelial cells. As found

in polarized endothelial (HLMEC) cells, the transfection efficiency of PEI-polyplexes through the basolateral membrane in cystic fibrosis human airway epithelial (Σ CFTE29o-) cells did not vary with the cell polarization. This means that an efficient transfection of endothelial and epithelial cells could be achieved with PEI-polyplexes. However, polyplexes made with L-PEI have been reported to transfect mainly pneumocytes and rarely endothelial cells upon a systemic application suggesting that these polyplexes can cross the capillary lung barrier [38]. However, a severe inflammatory response in transfected lung was often observed with L-PEI/DNA complexes [39,40]. In fact, L-PEI present in free form in the polyplexes has been shown to be responsible for this toxic side effect *in vitro* [41,42] and could be responsible for the inflammatory response observed *in vivo*. A reduction in this toxicity could be obtained upon purification of PEI-polyplexes removing free PEI [42,43]. In contrast to endothelial cells, the transfection efficiency of His-polyplexes through the basolateral membrane was not affected by the polarization of Σ CFTE29o- cells. It was even close to that obtained with PEI-polyplexes. This result suggests that a productive internalization pathway of these polyplexes leading to an efficient gene expression takes place at the basolateral membrane in these polarized epithelial cells.

The conjugation of EC-specific ligands to pDNA polyplexes for an efficient targeting to the pulmonary endothelium may increase both the specificity and the uptake of polyplexes. Nevertheless, it may be noted that the apparent decrease in uptake of polyplexes observed upon EC polarization could be due in fact to a transendothelial passage without reduction of the uptake. If polyplexes pass efficiently through an endothelial monolayer, this opens the possibility to transfect selectively the underlying epithelial cells. Taking into account the fact that the level of the transfection efficiency of PEI- and His-polyplexes in the epithelial cell monolayer is close to that obtained upon systemic administration [38], a bilayer model of HLMEC and Σ CFTE29o- layers grown on opposite sides of a filter is a relevant model to design polymer-based gene delivery systems in the lung. The evaluation of the transendothelial passage of polyplexes using such a model is in progress in the laboratory.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Association Française contre les Myopathies and Vaincre la Mucoviscidose. E.M. receives a fellowship from Ligue Nationale contre le Cancer. We are grateful to Dr Dieter Gruenert (University of Vermont, Burlington, VT, USA) for Σ CFTE29o- cells.

References

1. Midoux P, Pichon C. Peptide-based gene delivery systems. In *Pharmaceutical Perspectives of Nucleic Acid-Based Therapeutics*,

- Mahato R, Wan Kim S (eds). Harwood Academic Publishers: 2001; 334–366.
2. Zuber G, Dauty E, Nothisen M, *et al.* Towards synthetic viruses. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; **52**: 245–253.
 3. Liu D, Ren T, Gao X. Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem* 2003; **10**: 1307–1315.
 4. Craig LE, Spelman JP, Strandberg JD, *et al.* Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology. *Microvasc Res* 1998; **55**: 65–76.
 5. Baumgartner I, Isner JM. Somatic gene therapy in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 2001; **63**: 427–450.
 6. Khurana R, Martin JF, Zachary I. Gene therapy for cardiovascular disease: a case for cautious optimism. *Hypertension* 2001; **38**: 1210–1216.
 7. Suh W, Han SO, Yu L, *et al.* An angiogenic, endothelial-cell-targeted polymeric gene carrier. *Mol Ther* 2002; **6**: 664–672.
 8. Abdallah B, Hassan A, Benoist C, *et al.* A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 1996; **7**: 1947–1954.
 9. Tanner FC, Carr DP, Nabel GJ, *et al.* Transfection of human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1997; **35**: 522–528.
 10. Kader KN, Sweany JM, Bellamkonda RV. Cationic lipid-mediated transfection of bovine aortic endothelial cells inhibits their attachment. *J Biomed Mater Res* 2002; **60**: 405–410.
 11. Tan PH, Manunta M, Ardjomand N, *et al.* Antibody targeted gene transfer to endothelium. *J Gene Med* 2003; **5**: 311–323.
 12. Collins L, Fabre JW. A synthetic peptide vector system for optimal gene delivery to corneal endothelium. *J Gene Med* 2004; **6**: 185–194.
 13. Gruneich JA, Price A, Zhu J, *et al.* Cationic corticosteroid for nonviral gene delivery. *Gene Ther* 2004; **11**: 668–674.
 14. Zanic V, Weltrin D, Erbacher P, *et al.* Effective polyethylenimine-mediated gene transfer into human endothelial cells. *J Gene Med* 2004; **6**: 176–184.
 15. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 7297–7301.
 16. Boussif O, Zanta MA, Behr JP. Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther* 1996; **3**: 1074–1080.
 17. Kichler A. Gene transfer with modified polyethylenimines. *J Gene Med* 2004; **6**(Suppl 1): S3–10.
 18. Pichon C, Goncalves C, Midoux P. Histidine rich peptides and polymers for nucleic acids delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; **53**: 75–94.
 19. Kieda C, Paprocka M, Krawczenko A, *et al.* New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes. *Endothelium* 2002; **9**: 247–261.
 20. Kunzelmann K, Schwiebert EM, Zeitlin PL, *et al.* An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the delta F508 CFTR mutation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; **8**: 522–529.
 21. Chen TR. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res* 1977; **104**: 255–262.
 22. Brasier AR, Tate JE, Habener JF. Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *Biotechniques* 1989; **7**: 1116–1122.
 23. Midoux P, Monsigny M. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjugate Chem* 1999; **10**: 406–411.
 24. Bello Roufai M, Midoux P. Histidylated polylysine as DNA vector: elevation of the imidazole protonation and reduced cellular uptake without change in the polyfection efficiency of serum stabilized negative polyplexes. *Bioconjugate Chem* 2001; **12**: 92–99.
 25. Ogris M., Wagner E., Steinlein P. A versatile assay to study cellular uptake of gene transfer complexes by flow cytometry. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1474**: 237–243.
 26. Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, *et al.* Filippin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 1994; **127**: 1217–1232.
 27. Gortlieb AI, Langille BL, Wong MK, *et al.* Structure and function of the endothelial cytoskeleton. *Lab Invest* 1991; **65**: 123–137.
 28. Liu SM, Magnusson KE, Sundqvist T. Microtubules are involved in transport of macromolecules by vesicles in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol* 1993; **156**: 311–316.
 29. Liu SM, Sundqvist T. Effects of hydrogen peroxide and phorbol myristate acetate on endothelial transport and F-actin distribution. *Exp Cell Res* 1995; **217**: 1–7.
 30. Sundqvist T, Liu SM. Hydrogen peroxide stimulates endocytosis in cultured bovine aortic endothelial cells. *Acta Physiol Scand* 1993; **149**: 127–131.
 31. Bogatcheva NV, Verin AD, Wang P, *et al.* Phorbol esters increase MLC phosphorylation and actin remodeling in bovine lung endothelium without increased contraction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; **285**: L415–L426.
 32. Zuhorn IS, Kalicharan R, Hoekstra D. Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *J Biol Chem* 2002; **277**: 18 021–18 028.
 33. Kopatz I, Remy JS, Behr JP. A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J Gene Med* 2004; **6**: 769–776.
 34. Tewes BJ, Galla HJ. Lipid polarity in brain capillary endothelial cells. *Endothelium* 2001; **8**: 207–220.
 35. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; **387**: 569–572.
 36. Hoekstra D, Maier O, van der Wouden JM, Slimane TA, van ISC. Membrane dynamics and cell polarity: the role of sphingolipids. *J Lipid Res* 2003; **44**: 869–877.
 37. Gonçalves C, Mennesson E, Fuchs R, *et al.* Macropinocytosis of polyplexes and recycling of plasmid via the clathrin-dependent pathway impair the transfection efficiency of human hepatocarcinoma cells. *Mol Ther* 2004; **10**: 373–385.
 38. Goula D, Becker N, Lemkine GF, *et al.* Rapid crossing of the pulmonary endothelial barrier by polyethylenimine/DNA complexes. *Gene Ther* 2000; **7**: 499–504.
 39. Uduehi AN, Stammberger U, Kubisa B, *et al.* Effects of linear polyethylenimine and polyethylenimine/DNA on lung function after airway instillation to rat lungs. *Mol Ther* 2001; **4**: 52–57.
 40. Erbacher P, Bettinger T, Brion E, *et al.* Genuine DNA/polyethylenimine (PEI) complexes improve transfection properties and cell survival. *J Drug Target* 2004; **12**: 223–236.
 41. Wiseman JW, Goddard CA, McLelland D, *et al.* A comparison of linear and branched polyethylenimine (PEI) with DCChol/DOPE liposomes for gene delivery to epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther* 2003; **10**: 1654–1662.
 42. Clamme JP, Azoulay J, Mely Y. Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* 2003; **84**: 1960–1968.
 43. Boeckle S, von Gersdorff K, van der Piepen S, Culmsee C, Wagner E, Ogris M. Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J Gene Med* 2004; **6**: 1102–1111.

C| Conclusion.

Les polyplexes PEI sont internalisés par une voie dépendante de la clathrine aussi bien dans les cellules non polarisées que dans les cellules polarisées. L'efficacité de transfection de ces polyplexes n'est pas modifiée par la polarisation des cellules. Dans les cellules polarisées, bien que la quantité de polyplexes PEI internalisés soit moins importante, l'efficacité de transfection est similaire à celle obtenue avec les cellules non polarisées. Cela est sans doute possible car la voie d'endocytose de ces polyplexes n'est pas modifiée par la polarisation cellulaire. Dans les cellules non polarisées, les polyplexes pLK-His sont internalisés via une voie dépendante de la clathrine où le cholestérol est impliqué. La polarisation des cellules abolit fortement cette voie d'endocytose ce qui réduit très nettement l'accumulation des polyplexes pLK-His dans les cellules HLMEC. L'efficacité de transfection des vecteurs pLK-His reposant sur leur capacité à sortir des endosomes faiblement acides après protonation des noyaux imidazoles, la polarisation cellulaire, en diminuant l'endocytose dépendante de la clathrine, diminue par la même leur efficacité de transfection.

L'ensemble de ces résultats montre que les polyplexes PEI transfectent plus efficacement les cellules endothéliales polarisées que les polyplexes pLK-His.

L'efficacité de transfection des cellules épithéliales Σ CFTE290- avec les polyplexes pLK-His et PEI n'est pas influencée par l'état de polarisation des cellules montrant ainsi la variabilité des effets obtenus selon la nature des cellules. Dans le système utilisé, les cellules épithéliales polarisées sont cultivées sur la face inférieure du filtre. Les polyplexes doivent alors traverser le support poreux sur lequel les cellules adhèrent pour être internalisés *via* le côté basolatéral. Les polyplexes PEI transfectent tout aussi efficacement les cellules endothéliales et épithéliales alors que les polyplexes pLK-His sont plus efficaces pour les cellules épithéliales.

Ces résultats montrent que les vecteurs PEI sont de bons candidats pour le transfert de gènes dans les cellules endothéliales polarisées alors que les vecteurs pLK-His sont beaucoup moins efficaces. Par contre, la bonne efficacité de transfection des cellules épithéliales des voies aériennes avec les polyplexes pLK-His laisse à penser que s'ils sont capables de traverser efficacement la barrière endothéliale, ils constitueraient des vecteurs plus sélectifs que ceux formés avec la PEI qui eux transfectent de la même manière les cellules endothéliales et les cellules épithéliales.

Cette étude nous a permis de montrer que le modèle d'endothélium microvasculaire pulmonaire que nous avons établi peut être utilisé pour une évaluation systématique de différents vecteurs.

CHAPITRE II:

PASSAGE TRANSENDOTHELIAL DES POLYPLEXES.

A| Introduction.

Suite aux études effectuées précédemment, nous avons entrepris d'étudier le passage transendothélial des polyplexes pLK-His et PEI. Il n'existe pas à l'heure actuelle d'étude du passage de polyplexes à travers un modèle *in vitro* d'endothélium pulmonaire.

Le but de notre modèle d'endothélium étant d'analyser le passage transendothélial des polyplexes pLK-His et PEI, nous avons tout d'abord cherché à valider notre système c'est-à-dire à savoir si ces polyplexes étaient capables de traverser de façon intacte la monocouche de cellules HLMEC puis le filtre pour transférer des cellules sous-jacentes. Il s'agit, en effet, de déterminer quelle proportion de polyplexes est capable de traverser un filtre sans cellule et si ceux-ci conservent leur efficacité de transfection. Une fois notre modèle validé, une étude avec notre modèle d'endothélium a été entreprise. Enfin, une analyse du passage des polyplexes a été réalisée dans des conditions d'inflammation proches de celles rencontrées au niveau de l'endothélium pulmonaire dans la mucoviscidose et les cancers du poumon.

B| Résultats.

1) Etude du passage transendothélial des polyplexes pLK-His et PEI.

1.1) Passage des polyplexes à travers le filtre.

Nous avons tout d'abord déterminé quelle quantité de polyplexes était capable de traverser les filtres Falcon PET avec des pores de 3 μm de diamètre en absence de monocouche cellulaire et si ces polyplexes étaient capables de transférer efficacement des cellules. La quantification de ce passage a été réalisée par fluorescence en utilisant un plasmide marqué avec du YOYO-1.

Lorsque l'on dispose des polyplexes pLK-His et PEI dans un insert dans lequel il n'y a pas de cellules, on constate qu'à partir de 4 h et jusqu'à 12h, entre 9 et 14 % de l'ADN traversent la membrane poreuse (Figure 19 ligne 1). On peut donc considérer ce pourcentage comme la quantité maximale d'ADN qui peut traverser l'insert en 12 h. On constate que la quantité d'ADN avec les polyplexes pLK-His et PEI en suspension dans l'insert diminue fortement entre 4 h et 12 h sans que cette diminution conduise proportionnellement à une augmentation de la quantité d'ADN dans le puits. La surface des pores ne représente que 5,7 % de la surface totale du filtre. Une quantité importante d'ADN est donc arrêtée par le filtre et ne peut passer à travers les pores.

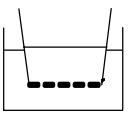
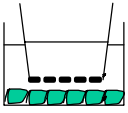
		ADN/pLK-His			ADN/jetPEI™			
		4h	6h	12h	4h	6h	12h	
	1	insert	50 ± 2	36 ± 7	35 ± 3	62 ± 6	52 ± 4	37 ± 3
		puits	9 ± 1	9 ± 1	12 ± 3	9 ± 2	9 ± 2	14 ± 3
	2	Insert	51 ± 5	35 ± 2	33 ± 3	54 ± 7	47 ± 1	38 ± 1
		Puits	9 ± 4	9 ± 3	9 ± 3	7 ± 2	8 ± 1	9 ± 4

Figure 19 : Pourcentage des polyplexes présents dans le milieu. Les polyplexes sont formés avec du pSV2luc marqué avec l'intercalant YOYO-1 (491/509). La fluorescence des polyplexes restant dans le milieu est mesurée. Elle est exprimée en pourcentage de la fluorescence des polyplexes mis dans l'insert au début de l'expérience.

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'ADN qui a traversé le filtre est libre ou complexé au vecteur. Afin de caractériser les polyplexes restés dans l'insert et ceux ayant traversés le filtre, leur taille et leur charge globale de surface ont été mesurées respectivement par diffusion dynamique de la lumière et par migration électrophorétique en utilisant le ZetaSizer 3000. Après 4 h d'incubation, les polyplexes pLK-His et PEI filtrés par l'insert ont une taille, respectivement, 1,6 et 1,4 fois inférieure à la taille des polyplexes restés dans l'insert (Tableau 13). Après filtration, la charge globale des polyplexes est également diminuée.

Tableau 13: Taille et charge globale des polyplexes pLK-His et PEI avant et après passage à travers un filtre.

		Polyplexes dans l'insert	Polyplexes dans le puits
Polyplexes pLK-His	Taille (nm)	641,9 ± 172	410,2 ± 22,3
	Charge globale (mV)	-6,9 ± 3,5	-12,9 ± 0,3
Polyplexes PEI	Taille (nm)	550,2 ± 31,7	394,8 ± 22
	Charge globale (mV)	-7,8 ± 1,7	-12,3 ± 1

Pour préciser l'état de condensation des deux populations de polyplexes pLK-His, ces polyplexes ont été dissociés en présence de SYBER Green et de sulfate de dextran de poids moléculaire 500 000 Da. Ce polymère anionique va entrer en compétition avec le plasmide pour se lier au polymère pLK-His. Cette compétition provoque la décondensation de l'ADN. Le SYBER Green présent dans la solution va pouvoir alors s'intercaler entre les paires de bases de l'ADN et émettre une fluorescence. L'augmentation de la fluorescence traduira une décondensation du plasmide.

Lorsque l'on dissocie les polyplexes pLK-His restés dans l'insert et les polyplexes ayant traversés le filtre avec un excès de sulfate de dextran (260 µg/ml), l'augmentation de la fluorescence est similaire à 4 h et 6 h (Tableau 14). Ce résultat indique que la condensation des deux populations de polyplexes est identique.

Tableau 14: Taux de condensation des polyplexes pLK-His avant et après passage au travers d'un filtre.

	insert	puits
4 h	2,39 ± 0,12	2,23 ± 0,06
6 h	2,25 ± 0,21	2,26 ± 0,09

Cette étude montre qu'un faible pourcentage (~10%) de polyplexes traversent les pores du filtre sur lequel sera cultivée la monocouche de cellules endothéliales. Ces polyplexes sont plus petits et plus négatifs que les polyplexes non filtrés. On n'observe cependant pas de variation de l'état de condensation de l'ADN.

Nous avons ensuite évalué l'efficacité de transfection des polyplexes filtrés par rapport aux polyplexes non filtrés.

Après 4 h et 6 h d'incubation, l'efficacité de transfection des polyplexes PEI qui ont traversé le filtre est plus importante que celle des polyplexes PEI incubés directement sur les cellules et ce malgré une quantité 10 fois inférieure (Figure 20 A). Cette efficacité est similaire après 12 h d'incubation. Ce résultat surprenant peut s'expliquer par le phénomène de filtration des polyplexes. En effet, il est connu que la formation de polyplexes PEI laisse dans le milieu une grande quantité de PEI libre, toxique pour les cellules (Clamme *et al.*, 2003). La toxicité des polyplexes filtrés serait d'autant plus réduite qu'une quantité importante de cette PEI libre serait arrêtée par le filtre. Cette baisse de la quantité de PEI libre serait favorable à une meilleure efficacité de transfection malgré une quantité de polyplexes 10 fois inférieure.

Les polyplexes pLK-His filtrés transfectent moins efficacement les cellules par rapport aux polyplexes directement incubés sur les cellules, de l'ordre d'une unité logarithmique (Figure 20 B).

Nous avons également noté une augmentation de l'efficacité de transfection des polyplexes pLK-His lorsque ceux-ci sont internalisés *via* le côté basolatéral des cellules épithéliales ($5,7 \cdot 10^6$ RLU/mg de protéine, Chapitre I) par rapport au côté apical ($1,8 \cdot 10^6$ RLU/mg de protéine). Quel que soit le pôle cellulaire considéré, les polyplexes PEI présentent une efficacité similaire ($8,6 \cdot 10^8$ RLU/mg de protéine pour le côté apical vs $6,8 \cdot 10^7$ RLU/mg de protéine pour le côté basolatéral).

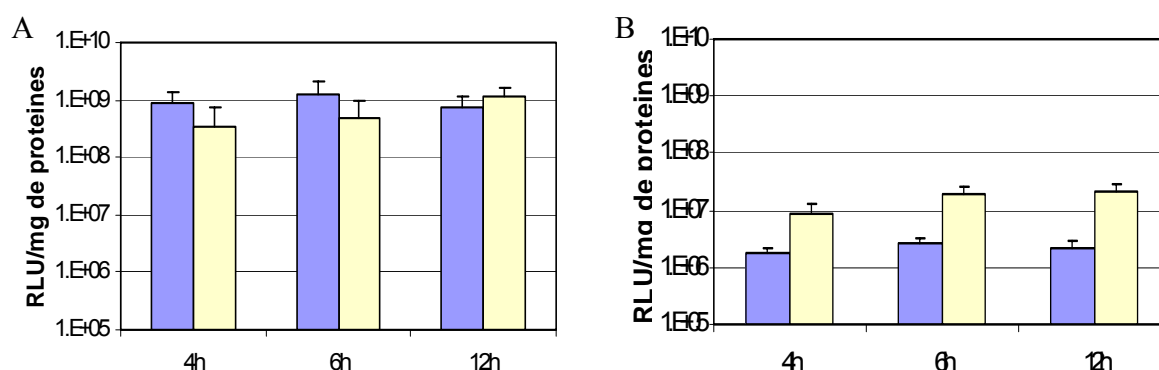


Figure 20 : Efficacité de transfection des cellules Σ CFTE290- par des polyplexes PEI (A) et pLK-His (B). Les histogrammes bleus représentent la transfection des Σ CFTE290- par des polyplexes filtrés. Les histogrammes jaunes représentent la transfection des Σ CFTE290- par des polyplexes non filtrés. Les polyplexes sont formés avec le plasmide pUT650 et incubés 4 h, 6 h ou 12 h avec les cellules. Après 48 h, l'expression de la luciférase est mesurée et rapportée à la quantité de protéines totale.

Pour savoir si la filtration permet de sélectionner des polyplexes plus efficaces, l'efficacité de transfection de polyplexes filtrés a été comparée à l'efficacité de transfection d'une quantité de polyplexes diluée par 10 (Figure 21). Lorsque les polyplexes non filtrés sont dilués 10 fois, leur efficacité de transfection diminue également d'un facteur 10 par rapport aux polyplexes filtrés. Pour une quantité de polyplexes sensiblement égale, l'efficacité de transfection des polyplexes filtrés est donc supérieure. Il existe donc bien un effet spécifique de la filtration des polyplexes à travers la membrane poreuse qui sélectionnerait des polyplexes plus efficaces pour la transfection des cellules Σ CFTE29₀-.

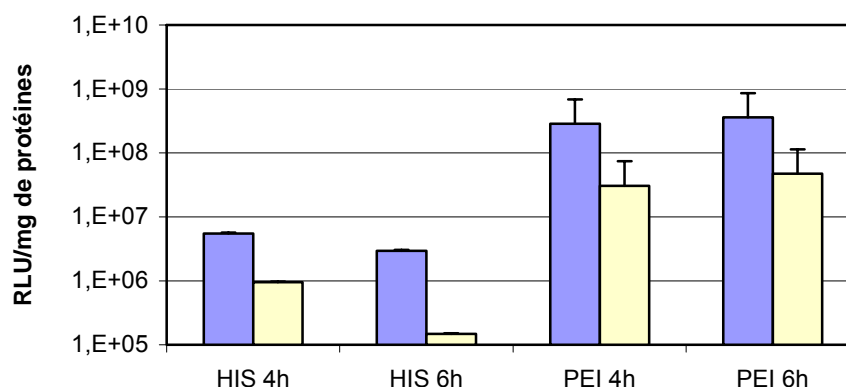


Figure 21 : Efficacité de transfection des cellules Σ CFTE29₀- par des polyplexes PEI et pLK-His. Les histogrammes bleus représentent la transfection des Σ CFTE29₀- par des polyplexes filtrés. Les histogrammes jaunes représentent la transfection des Σ CFTE29₀- avec 10% des polyplexes non filtrés. Les polyplexes sont formés avec le plasmide pUT650 et incubés 4 h ou 6 h avec les cellules. Après 48 h, l'expression de la luciférase est mesurée et rapportée à la quantité de protéines totale.

Les polyplexes PEI et pLK-His sont donc capables de traverser le filtre de façon intacte et transfecter les cellules épithéliales. Nous avons ensuite cherché à savoir si les polyplexes étaient capables de traverser la monocouche de cellules endothéliales et s'ils étaient toujours capables de transfecter les cellules sous-jacentes.

1.2) Quantification du passage transendothélial.

La quantification des polyplexes pLK-His et PEI dans les milieux de l'insert et du puits a été réalisée comme précédemment mais avec la présence de la monocouche de cellules endothéliales HLMEC cultivée sur le filtre.

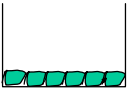
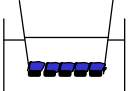
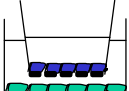
		ADN/pLK-His			ADN/jetPEI™			
		4h	6h	12h	4h	6h	12h	
	3	puits	70 ± 3	50 ± 5	35 ± 4	60 ± 5	46 ± 4	37 ± 4
		4	insert	62 ± 4	51 ± 5	49 ± 3	60 ± 3	38 ± 2
		puits	1,5 ± 1	1 ± 1,5	3 ± 1,5	4 ± 2	5 ± 2	5 ± 1
	5	insert	79 ± 6	40 ± 4	49 ± 5	51 ± 2	36 ± 1	37 ± 6
		puits	1 ± 1,5	7 ± 4	3 ± 1	4 ± 3	3 ± 1	3 ± 2

Figure 22 : Pourcentage des polyplexes présents dans le milieu. Les polyplexes sont formés avec du pSV2luc marqué avec l'intercalant YOYO-1 (491/509). La fluorescence des polyplexes restant dans le milieu est mesurée. Elle est exprimée en pourcentage de la fluorescence des polyplexes mis dans l'insert au début de l'expérience.

La figure 22 montre que, par rapport au passage en absence de la monocouche, la monocouche de cellules HLMEC diminue 2 fois le passage de polyplexes PEI après 4 h (9% vs 4%) et 6 h (9% vs 5%) et 3 fois après 12 h (14% vs 5%) (Figure 19 ligne 1). Le passage des polyplexes pLK-His est plus diminué, de 4 à 9 fois. Les polyplexes PEI traversent donc la monocouche plus efficacement que les polyplexes pLK-His. L'ADN qui a traversé la monocouche de cellules endothéliales ne migre pas en électrophorèse de gel d'agarose et est donc sous forme de polyplexes (Figure 23).



Figure 23 : Etat de condensation de l'ADN. Les milieux dans l'insert et dans le puits sont récupérés après 4 h d'incubation et sont concentrés. L'état de condensation de l'ADN est ensuite analysé sur gel d'agarose. 1 : polyplexes PEI dans l'insert, 2 : polyplexes PEI dans le puits, 3 : polyplexes pLK-His dans l'insert, 4 : polyplexes pLK-His dans le puits.

Malgré cette diminution de la quantité de polyplexes pLK-His et PEI présente au contact des cellules Σ CFTE29₀₋, l'efficacité de transfection de ces polyplexes est tout à fait similaire à celle des polyplexes filtrés (Figure 24). Bien que les polyplexes pLK-His traversent moins efficacement la monocouche que les polyplexes PEI, ils conservent la même efficacité de transfection qu'en absence de cellules HLMEC.

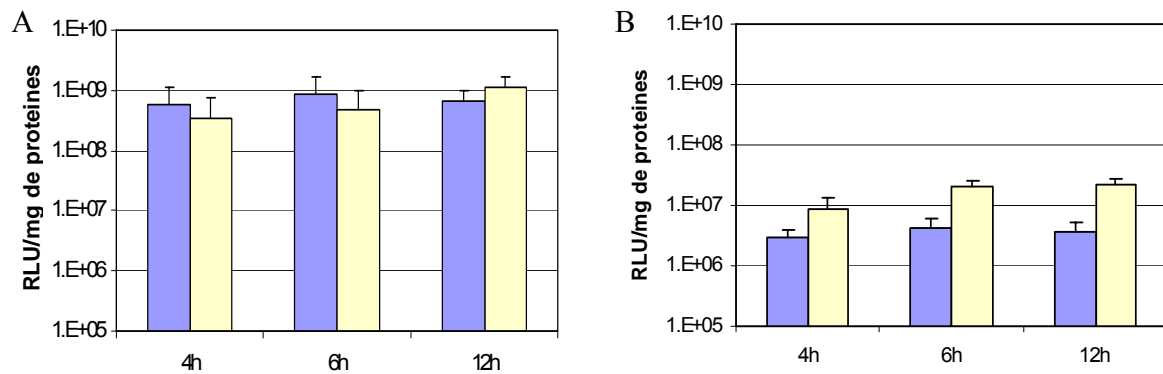


Figure 24 : Efficacité de transfection des cellules Σ CFTE290- par des polyplexes PEI (A) et pLK-His (B). Les histogrammes bleus représentent la transfection des Σ CFTE290- par des polyplexes introduits dans l'insert sur lequel est cultivée une monocouche de cellules HLMEC. Les histogrammes jaunes représentent la transfection des Σ CFTE290- par des polyplexes non filtrés. Les polyplexes sont formés avec le plasmide pUT650 et incubés 4 h, 6 h ou 12 h avec les cellules. Après 48 h, l'expression de la luciférase est mesurée et rapportée à la quantité de protéines totale.

Les polyplexes pLK-His et PEI sont donc capables de traverser la monocouche de cellules endothéliales et transférer les cellules épithéliales. Ce passage transendothélial ne s'accompagne pas d'une modification significative de la résistance transendothéliale. Ce résultat semble être en faveur de la transcytose des polyplexes. Toutefois, la précision des mesures de résistance ne permet pas de distinguer l'ouverture partielle des jonctions intercellulaires. De plus, si les polyplexes comblerent les ouvertures des jonctions, la résistance transendothéliale pourrait ne pas diminuer. La voie paracellulaire pourrait ainsi être responsable d'une grande partie du passage transendothélial sans se traduire pour autant par un changement significatif de la résistance transendothéliale.

2) Effet des cytokines sur le passage transendothélial des polyplexes.

Après avoir montré que les polyplexes PEI et pLK-His sont capables de traverser la monocouche de cellules endothéliales et transférer les cellules épithéliales, nous avons étudié la perméabilité de la monocouche de cellules HLMEC en condition d'inflammation. Ces conditions sont présentes au niveau de l'endothélium microvasculaire du poumon dans la mucoviscidose et dans certains cancers du poumon. Les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α sont parmi les premières cytokines sécrétées par les macrophages suite à une infection dans les poumons chez les patients CF (Wilmott *et al.*, 1994; Bonfield *et al.*, 1995). Les macrophages alvéolaires de patients atteints de cancer du poumon sécrètent significativement plus ces deux cytokines (Matanic *et al.*, 2003). Leur concentration est également significativement plus élevée dans le sérum des patients atteints de cancers non à petites cellules (De Vita *et al.*, 1998).

Nous avons, tout d'abord, observé l'effet d'une incubation de 18 h avec différentes concentrations de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α sur le passage transendothélial d'une protéine telle que la SAB (Figure 25). Les cytokines sont ajoutées à la fois dans l'insert et dans le puits.

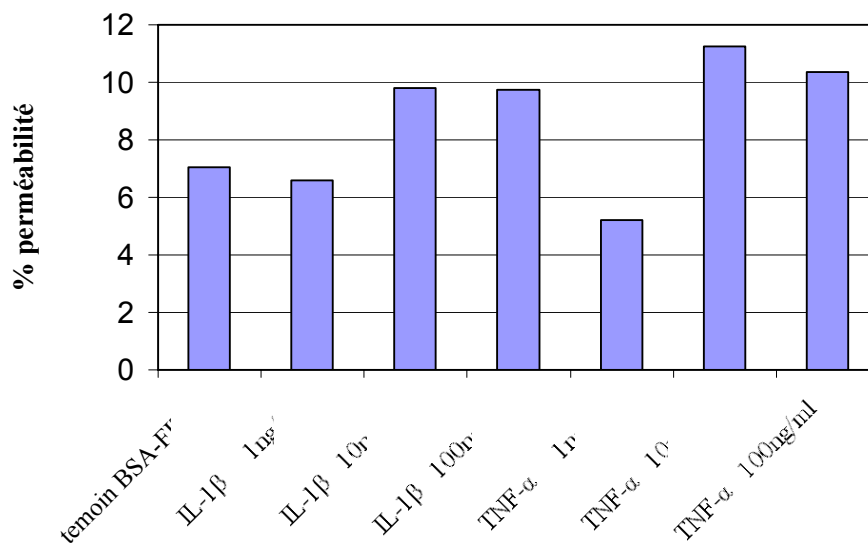


Figure 25 : Pourcentage de SAB-FITC ayant traversé la monocouche de cellules HLMEC en condition d'inflammation. Les cellules sont incubées 18 h avec les cytokines IL-1 β et TNF- α puis avec la SAB-FITC (100 μ g/ml) pendant 2 h. La perméabilité est exprimée en pourcentage de la quantité de SAB-FITC ayant traversé la monocouche de cellules HLMEC par rapport à la quantité de SAB-FITC introduite dans l'insert au début de l'expérience.

La figure 25 montre qu'une concentration de 10 ng/ml d'IL-1 β et de TNF- α est suffisante pour augmenter le passage transendothélial de la SAB. De plus, à 100 ng/ml, la perméabilité de la monocouche pour la SAB est similaire. Le principal effet de ces cytokines sur l'intégrité de la barrière endothéliale est l'augmentation de la perméabilité vasculaire par ouverture des jonctions intercellulaires (Blum *et al.*, 1997). Il a également été montré que ces cytokines pouvaient stimuler la transcytose (Miller *et al.*, 2005).

Pour élucider le mode de passage de la SAB, nous avons étudié, toujours en conditions d'inflammation, la perméabilité des cellules endothéliales au dextran de 9400 Da (Figure 26). Le dextran ne peut emprunter une voie intracellulaire, il est donc utilisé comme indicateur de la voie paracellulaire. Le transport du dextran n'est pas modifié après incubation des cellules endothéliales avec les cytokines IL-1 β et TNF- α .

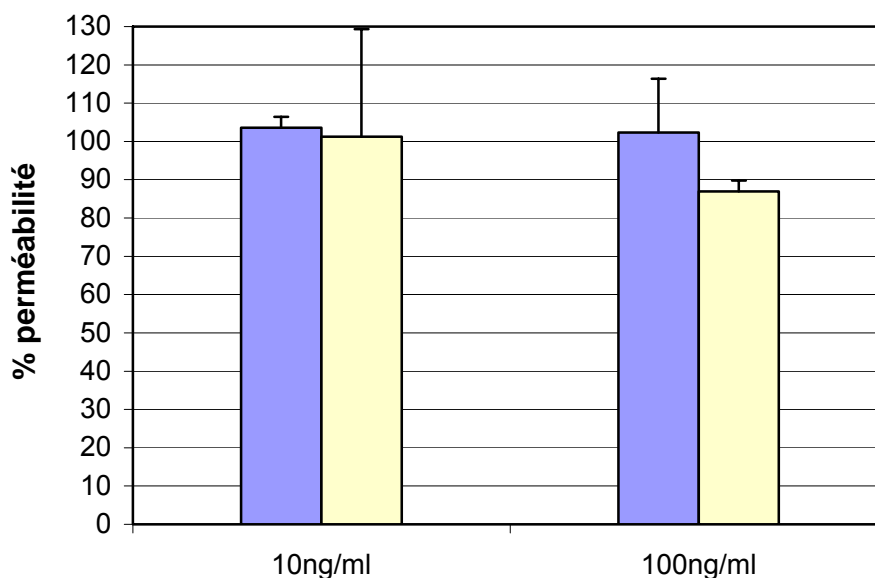


Figure 26 : Pourcentage de dextran ayant traversé la monocouche de cellules HLMEC en condition d'inflammation. Les cellules sont incubées 18 h avec les cytokines IL-1 β (histogrammes bleus) et TNF- α (histogrammes jaunes). Les cellules sont ensuite incubées avec du dextran (20 μ g/ml) de 9400 Da pendant 2 h. La perméabilité est exprimée en pourcentage du passage transendothélial du dextran dans des conditions non inflammatoires.

Il a été montré que IL-1 β et TNF- α augmentaient la perméabilité paracellulaire de monocouche de cellules endothéliales *in vitro* par l'ouverture des jonctions intercellulaires. Pour des concentrations de 10 et 100 ng/ml de cytokines, les jonctions serrées sont discontinues (Figure 27). Cependant, l'effet des cytokines sur les jonctions n'est pas assez important pour permettre le passage du dextran. En effet, la forte confluence des cellules pourrait empêcher le passage paracellulaire de la SAB et du Dextran. Les cytokines IL-1 β et TNF- α semblent donc favoriser la transcytose de la SAB.

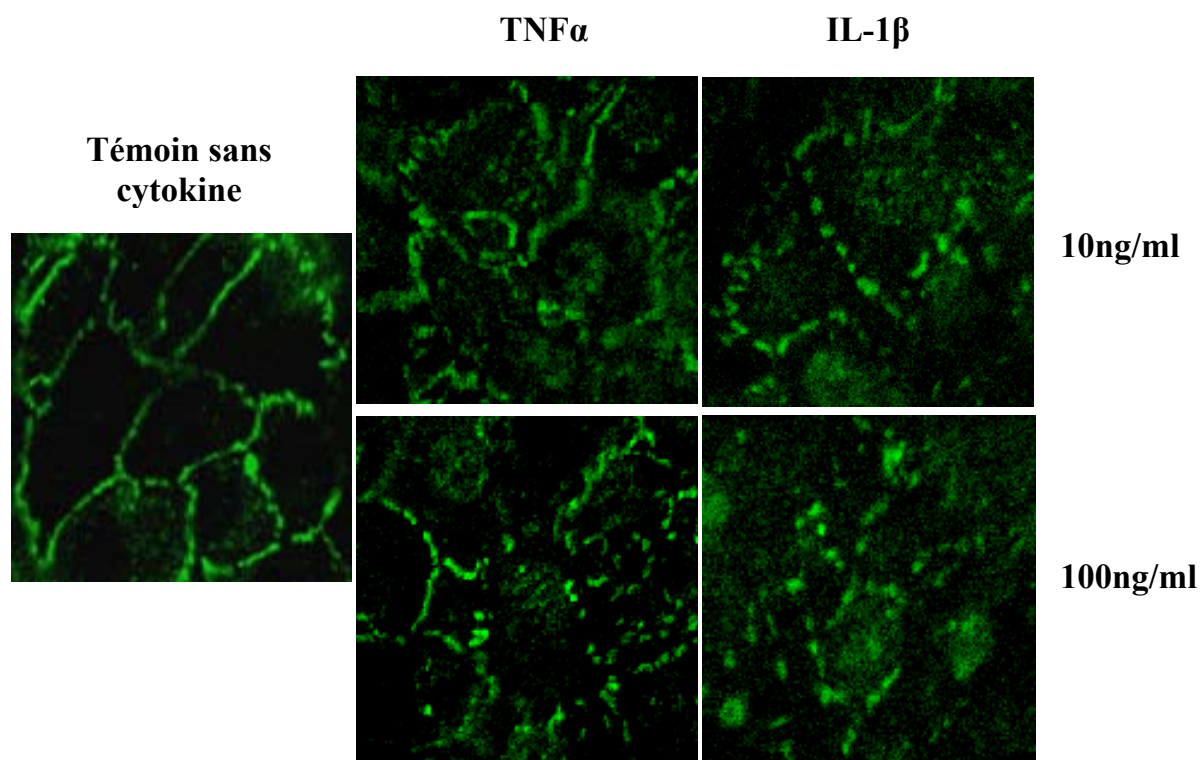


Figure 27 : Effet de l'IL-1 β et du TNF- α sur les jonctions serrées de la monocouche HLMEC. La monocouche est incubée 18 h avec les cytokines IL-1 β et TNF- α à 10 et 100 ng/ml puis la protéine ZO-1 est immunomarkée comme décrit dans Matériels et Méthodes.

Le passage transendothélial des polyplexes pLK-His et PEI en condition d'inflammation a été examiné avec ces deux concentrations de cytokines (Figure 28).

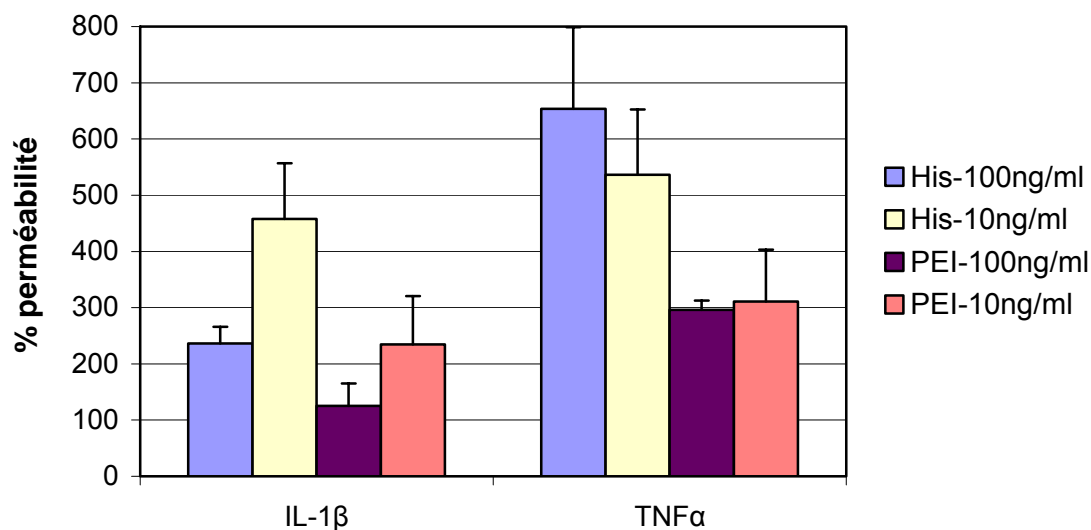


Figure 28 : Pourcentage de polyplexes ayant traversé la monocouche de cellules HLMEC en condition d'inflammation. Les cellules sont incubées 18 h avec les cytokines IL-1 β et TNF- α puis avec les polyplexes pendant 2 h. La perméabilité est exprimée en pourcentage du passage transendothélial des polyplexes dans des conditions non inflammatoires.

En condition d'inflammation, le passage transendothélial des polyplexes pLK-His est supérieur à celui des polyplexes PEI quel que soit les cytokines considérées et leur concentration. Pour les deux types de vecteurs, l'influence du TNF- α sur le passage transendothélial est plus importante qu'avec IL-1 β . Les conditions inflammatoires au niveau d'un endothélium microvasculaire sont plus favorables au passage transendothélial des polyplexes pLK-His que des polyplexes PEI.

Le traitement inflammatoire ne provoque qu'une faible ouverture des jonctions serrées insuffisante pour permettre le passage de la SAB et donc à fortiori de polyplexes. Cependant, en raison de la taille des polyplexes, il est peu probable que la transcytose puisse expliquer cette augmentation du passage transendothélial des polyplexes. En effet, seules des particules d'une taille inférieure à 100 nm sont théoriquement capables d'emprunter cette voie. Il est donc fort probable que l'augmentation du passage des polyplexes se fasse par la voie paracellulaire. Les polyplexes pourraient, en effet, induire un stress cellulaire qui favoriserait une plus grande ouverture des jonctions. Dans un environnement inflammatoire, la voie paracellulaire pourrait donc être la voie majoritairement empruntée par les polyplexes.

C| Conclusion.

Les résultats montrent que les polyplexes PEI et pLK-His sont capables de traverser la membrane poreuse de l'insert. Cependant, seulement 10 à 15 % d'entre eux traversent la membrane en 12h. Malgré ce faible passage, l'efficacité de transfection des polyplexes PEI filtrés est similaire à celle de l'ensemble des polyplexes introduits dans l'insert. L'efficacité de transfection des polyplexes pLK-His est, elle, diminuée. Cependant, elle reste supérieure à l'efficacité de transfection correspondant à la même quantité de polyplexes non filtrés. Cette filtration à travers la membrane de l'insert semble sélectionner des polyplexes plus efficaces pour transférer des cellules épithéliales. Ces polyplexes sont caractérisés par une plus petite taille et une charge globale de surface plus négative. De plus, dans le cas des polyplexes PEI, la filtration diminuerait la quantité de PEI libre dans le puits et donc la cytotoxicité des polyplexes. Les polyplexes PEI et pLK-His sont également capables de traverser la monocouche de cellules endothéliales de façon intacte et de transférer les cellules épithéliales tout aussi efficacement que les polyplexes filtrés en absence de cellules. Les polyplexes PEI semblent traverser plus efficacement la monocouche que les polyplexes pLK-His.

Notre système de culture de cellules endothéliales polarisées sur filtre est donc un modèle d'endothélium pulmonaire pertinent pour l'étude du passage transendothélial de polyplexes.

Chez les patients atteints de mucoviscidose ou d'un cancer du poumon, une inflammation de l'endothélium pulmonaire est observée. En examinant l'effet des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α sur le passage transendothélial des polyplexes pLK-His et PEI, nous avons constaté que le passage transendothélial des polyplexes pLK-His et PEI est augmenté. Ces cytokines agissent sur l'intégrité des jonctions serrées. Cette ouverture partielle des jonctions permet l'augmentation du passage transendothélial de macromolécules comme l'albumine. Cependant la perméabilité de la monocouche au dextran de 9400 Da n'est pas modifiée. Comme les polyplexes ont une taille bien supérieure à celle de ces macromolécules, l'augmentation de leur passage ne peut s'expliquer que par une action sur les jonctions intercellulaires. Ils pourraient, en effet, induire un stress des cellules endothéliales qui déstructurerait ainsi un peu plus les jonctions déjà fragilisées par les cytokines.

Pour s'approcher des conditions physiologiques de l'endothélium microvasculaire pulmonaire, nous avons ajouté une monocouche de cellules épithéliales cultivées au dos de la membrane de l'insert comme le montre la figure 29. Avec ce montage, le passage transendothélial des polyplexes se fait *via* la membrane apicale des cellules endothéliales et leur pénétration dans les cellules épithéliales *via* la membrane basale. Cette configuration est plus proche de la réalité physiologique.

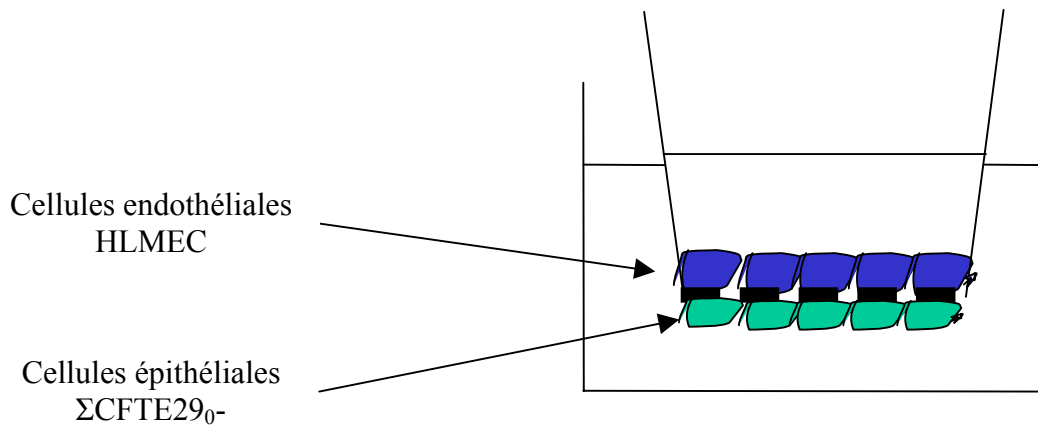


Figure 29 : Modèle en bicouche de l'endothélium pulmonaire.

Sur ce modèle, nous avons réalisé des études préliminaires sur le passage transendothélial en mesurant l'efficacité de transfection des polyplexes pLK-His et PEI dans les cellules épithéliales. Les premiers résultats ont montré que les cellules Σ CFTE290- sont transfectées avec un niveau d'expression du gène proche de celui obtenu lorsque les cellules épithéliales sont cultivées au fond du puits.

CHAPITRE III:**ETUDES DE LA FIXATION DES POLYPLEXES SUR UNE MONOCOUCHE DE CELLULES HLMEC EN CONDITIONS DE FLUX.****A) Introduction.**

Nous avons vu dans le chapitre I que l'internalisation de certains polyplexes (pLK-His) et l'efficacité de transfection peuvent varier lorsque les cellules endothéliales sont polarisées. Lors d'une administration systémique, l'interaction des polyplexes avec l'endothélium vasculaire est soumise aux effets mécaniques du flux sanguin. Or l'impact de ces effets n'a jusqu'à présent pas été considéré et leur importance sous-estimé dans l'élaboration des vecteurs synthétiques. Très récemment, Harris et Giorgio (2005) ont analysé les conséquences des conditions de flux sur le transfert de gènes par lipofection.

Nous avons voulu analyser les effets du flux rencontré dans les microvaisseaux et les vénules sur l'adhésion des polyplexes pLK-His et PEI sur une monocouche de cellules HLMEC.

Pour cela, nous avons utilisé la chambre de flux CAF-10 d'Immunetics dans laquelle on peut faire varier les contraintes de cisaillement agissant sur la surface de la monocouche de cellules endothéliales (Figure 30). Dans ce système de flux, la dynamique des fluides gouverne les phénomènes physiques qui s'y déroulent.

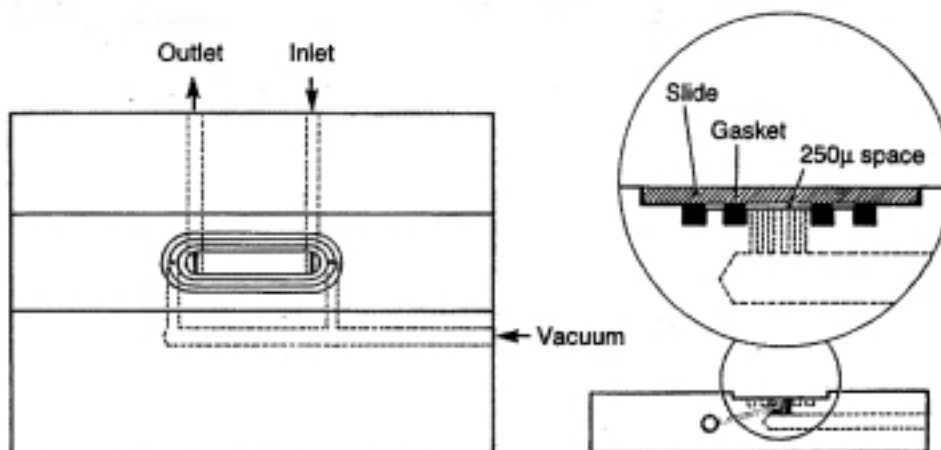


Figure 30: Schéma de la chambre de flux CAF-10 d'Immunetics.

On peut donc déterminer le type de régime, laminaire ou turbulent, régnant dans la chambre de flux, en calculant le nombre de Reynolds donné par :

$$Re = (\rho \cdot v \cdot D) / \eta$$

Avec ρ = masse volumique du fluide ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), v = vitesse moyenne ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), D = diamètre hydraulique de la conduite (m), η = viscosité dynamique du fluide (Pa.s).

La chambre de flux forme une conduite de section rectangulaire. Le diamètre hydraulique se calcule alors de la façon suivante :

$$D = 2w \cdot h / (w+h)$$

Avec w = largeur interne exprimée en m, h = hauteur interne exprimée en m.

Si $Re < 2000$, le régime est laminaire, $2000 < Re < 3000$, le régime est intermédiaire et $Re > 3000$, le régime est turbulent.

Avec cette chambre, les calculs montrent que Re est <5 quelles que soient les vitesses appliquées au système. L'écoulement est donc laminaire et la relation entre la vitesse volumique et les contraintes de cisaillement s'écrit :

$Q = (\tau w.h^2) / 6\mu$ où μ est la viscosité du milieu exprimée en $\text{dyn}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$, w la largeur interne de la chambre de flux exprimée en cm , h la hauteur interne de la chambre de flux exprimée en cm , τ la contrainte de cisaillement exprimée en dyn/cm^2 et Q le flux exprimé en cm^3/s .

Dans la chambre de flux, le temps de résidence d'une particule $t = S.h / Q$ dépend du débit Q , de la surface S (la largeur w multipliée par la longueur l) et de la hauteur h . La possibilité pour les particules d'entrer en contact avec les cellules est envisageable seulement si $t > h / V$ (V = la vitesse de sédimentation), ou encore $V > Q/S$. Le terme Q/S est appelé vitesse de Hazen. La quantité de particules fixées est contrôlée par la sédimentation gravitationnelle et le mouvement brownien (Palsson et Andreadis, 1997). En absence de flux, la vitesse de sédimentation V est égale à $2g.r^2.(\rho_1-\rho_2) / 9\mu$ où g = constante de gravitation, r = rayon de la particule, ρ_1 = densité de la particule, ρ_2 = densité du milieu et μ = viscosité du milieu. Dans le système de Harris et Giorgio (2005), des particules de 100 nm et de 250 nm de diamètre ont des vitesses de sédimentation, respectivement, de $2,81.10^{-8}$ cm/s et de $1,75.10^{-7}$ cm/s . En conditions de flux, la vitesse translationnelle est égale à $dx/dt = \alpha h\gamma$ où $\gamma = \tau/\mu$. α est un facteur de corrélation qui dépend de la distance entre la particule et les cellules. En utilisant cette formule, Harris et Giorgio ont calculé la trajectoire de lipoplexes dans une chambre de flux de 2,5 cm de large et 220 μm de hauteur (contre 0,55 cm de large et 250 μm de hauteur pour la chambre de flux CAF-10) en fonction des contraintes de cisaillement et du diamètre des particules.

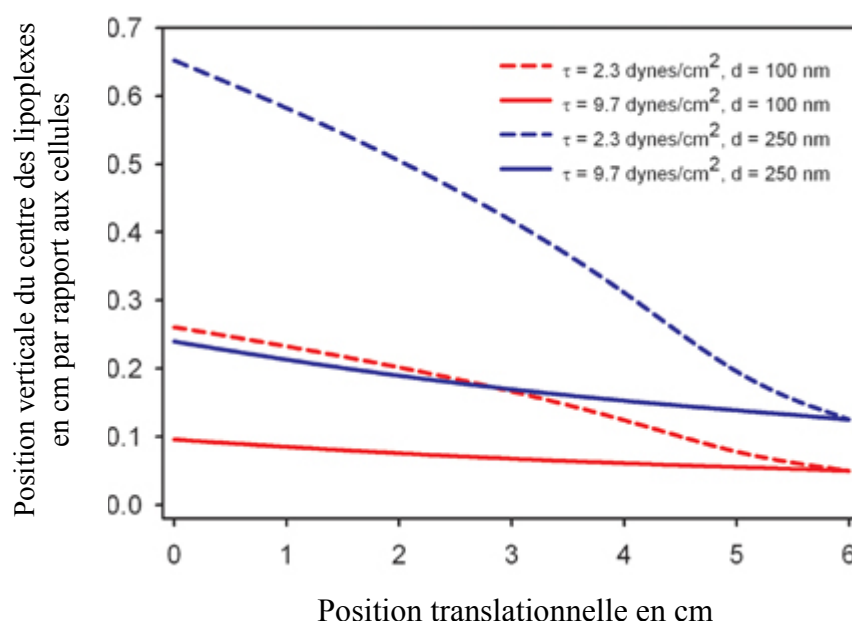


Figure 31 : Trajectoire des lipoplexes dans la chambre de flux. D'après Harris et Giorgio, 2005

La figure 31 représente une vue de la section longitudinale de la chambre de flux. Les courbes représentent la trajectoire du centre des lipoplexes qui entrent dans la chambre et qui adhèrent aux cellules après avoir parcouru une distance de 6 cm, soit la longueur de la chambre. La position $x = 0$ cm représente de point d'entrée du flux et la position $x = 6$ cm, la sortie de la chambre. A $x = 6$ cm, la position verticale représente la distance entre le centre de la particule fixée et les cellules. Pour chaque courbe, la position verticale en $x = 0$ cm indique

la hauteur maximale d'entrée des lipoplexes par rapport aux cellules pour qu'ils puissent se fixer sur celles-ci avant leur sortie de la chambre.

On peut donc voir que pour une force de cisaillement fixe, plus les particules sont grosses, plus le nombre de particules qui vont adhérer aux cellules sera grand. De même, pour une taille fixe, plus la force de cisaillement sera élevée, plus le nombre de particules qui vont entrer en contact avec les cellules sera faible.

Bien qu'établies pour des lipoplexes, ces courbes devraient s'appliquer aux polyplexes. Nous avons étudié les capacités de fixation de polyplexes formés avec la PEI et la pLK-His sur une monocouche de cellules endothéliales exposée à un flux laminaire constant.

B| Publication: Mennesson *et al.*, 2005.

Les résultats obtenus sont reportés dans le manuscrit ci-dessous intitulé:
" DNA/cationic polymer complexes binding capacities on a human vascular endothelial cell monolayer exposed to a steady laminar flow. " .

DNA/cationic polymer complexes binding capacities on a human vascular endothelial cell monolayer exposed to a steady laminar flow.

Eric Mennesson, Mateusz Kuzak, Patrick Erbacher[§], Claudine Kieda, Patrick Midoux and
Chantal Pichon^{*}

Centre de Biophysique Moléculaire UPR4301 CNRS affiliated to the University of Orléans
and INSERM, rue Charles Sadron- 45071 Orléans cedex 2, France. Tel : (+33) (0)2 38 25 54

58. Fax: (+33) (0)2 38 63 15 17.

E-mail : pichon@cnrs-orleans.fr

[§] Polyplus-Transfection SAS, BIOPARC, BP90018, 67401 Illkirch, France.

^{*}To whom correspondence should be addressed

Running title : Polyplexes-vascular membrane interaction in a fluid flow

Key words : polyplexes; histidine; polyethyleneimine; shear stress; lung endothelial cells;
time-lapse video microscopy.

ABSTRACT

We evaluated for the first time the impact of a fluid flow on the interaction of DNA/cationic polymer complexes (polyplexes) with a human lung endothelial cell (HLMEC) monolayer. The binding of fluorescent polyethyleneimine (PEI)- and histidylated polylysine (His)-polyplexes was carried out by time-lapse video microscopy over 30 min at 10 μg DNA/ml in 10% serum in a flow chamber connected to an opened flow system. The number of bound polyplexes per 1000 cells was 360 ± 80 and 250 ± 50 under a shear stress of 0.3 - 1 dyn/cm^2 and dropped to 120 ± 50 and 90 ± 50 under 2 dyn/cm^2 for PEI- and His-polyplexes, respectively. The binding of polyplexes was reduced by 37% in 100% serum and by 75% at 5 $\mu\text{g/ml}$ DNA. In contrast to PEI-polyplexes, which weakly interacted with HLMEC monolayer, the binding of polyplexes was augmented by 300% when PEI was conjugated with a tetraglucose moiety. Our results show that the set-up used in this study is appropriate to assess the physical characteristics of the polyplexes attachment on blood vessels of various origins and the screening of organ-specific endothelial cell ligands to elaborate smart non-viral vectors for clinical applications.

INTRODUCTION

Amongst synthetic gene delivery systems, polyplexes – electrostatic complexes between a cationic polymer (mostly polyamine) and a plasmid DNA (pDNA) – are under intensive developments¹⁻³. However, despite recent progresses to resolve intracellular limiting factors including endosome escape and nuclear import, *in vivo* disease models recovery have difficulties to give clinical success due to several drawbacks. To overcome them, *in vitro* researches need to make allowance for *in vivo* conditions. In a systemic administration, polyplexes introduced in the body intravenously, are confronted with the blood circulation and must cross endothelial layers to reach the target cells located in organs. The vascular endothelium is composed of endothelial cells (EC), which are able not only to select specific blood borne cells and molecules but also to transport them towards the tissue underneath. It is known that EC from blood vessels exhibit differences including various selection criteria for cells and molecules that are allowed to cross the endothelial barrier. Thus, these cells function as gatekeepers controlling the infiltration of specific cells or macromolecules into the vessel wall. The suitable model to approximate *in vivo* conditions is still under way but some *in vitro* studies tried to approach it⁴⁻⁷. One of the first *in vivo* feature considered was the cell polarization. Indeed, polarized cells have a specific phenotype as a consequence of differences in lipids and proteins distribution in the apical and the basal membranes⁸. The vascular endothelium is composed of polarized cells, and molecules from the blood stream are taken up only from the apical membrane while such membrane compartmentalization does not exist in non-polarized cells. We have recently established a cellular model of endothelium consisting of a cell monolayer of a human vascular lung endothelial cell line (HLMEC cells) that mimicked the endothelium lining lung blood microvessels⁹. We have evaluated the capture and the transfection efficiencies of DNA complexed with JET PEI™ (PEI-polyplexes) or histidylated polylysine (His-polyplexes), two types of cationic polymers which induce DNA compaction and exhibit membrane destabilization features in an acidic medium. By contrast with His-polyplexes, we showed that the HLMEC polarization has little influence on the uptake process and on the transfection efficiency of PEI-polyplexes. The blood flow is another important notion that needs to be considered for the capture, the transendothelial passage and the transfection efficiency of polyplexes *via* the vasculature. One can expect that some of these processes will be different under flow conditions. The addition of flow to a static system creates a shear stress on the surface of the cell monolayer which can increase mass transport and modulate cellular activities¹⁰⁻¹⁴. A fluid motion can decrease the interactions between polyplexes and the cell surface membrane. Physiological shear stresses in vasculature are ranged from 0.5-0.75 dyn/cm² to several dyn/cm² in microvessels and could attain 30 dyn/cm² in large vessels as artery^{15, 16}.

Here, we report for the first time a study of the capacity of polyplexes to bind on a polarized human lung EC monolayer under flow conditions. The investigations were conducted with DNA complexed with linear polyethyleneimine (JET PEI™)¹⁷ or histidylated polylysine¹⁸. The conducted experiments were in a similar mechanical context of physiological endothelial cells. Flow conditions mimic physiological blood flow with stimulation of physiological site density, distribution and presentation of specific molecules at the apical surface of EC. The use of EC in flow channels *in vitro* allows the control of chemical and mechanical factors rendering easier the investigation of cellular responses to different types of shear flows. The binding of polyplexes was investigated by video microscopy. The amount of bound polyplexes was measured as a function of the shear stress, time, DNA concentration and amount of serum. We found that His- and PEI-polyplexes weakly bound to the HLMEC monolayer under dynamic conditions. In contrast, the binding of polyplexes increased by 300% with glucose-grafted PEI.

RESULTS

HLMEC cells have been established as a tool to assess the molecular basis of lung endothelium selectivity¹⁹. These cells have preserved the phenotypic characteristics related to their tissue of origin. So, polarized HLMEC cells is an original *in vitro* cellular model to mimic the lung microvascular endothelium barrier allowing the investigations of polyplexes binding under flow conditions. The assembly of plasmid DNA with cationic polymers leads to a large reduction of the hydrodynamic size of the plasmid. First, we determined the size and the global charge (ζ potential) of His- and PEI-polyplexes (Table I). These polyplexes that were positively charged in the absence of serum (data not shown) were negatively charged in the presence of 10% and 100% serum as a consequence of the coating with anionic serum proteins. Therefore, electrostatic interactions of polyplexes with the negatively charged cell membrane might be reduced and their aggregation in physiological salt concentration prevented. The size distribution of polyplexes at 10 $\mu\text{g/ml}$ DNA measured by light scattering appeared homogeneous with a mean size ranged between 400 nm to 440 nm and a width size ranged between 70 nm to 100 nm in the presence of 10% serum (Fig. 1 and Table I). In 100% serum, PEI- and His-polyplexes size were smaller; their mean size were ~ 110 nm and ~ 170 nm, respectively and their width size 20 nm to 40 nm, respectively. While the size of the polyplexes in medium without serum increased with the time, their size remained stable over a 1 hour period (data not shown). The study of the motion of polyplexes under flow and their interactions with a cell monolayer can be analysed with similar approaches as used for spheres subjected to a fluid flow and their adhesion to a plane surface.²⁰⁻²³

Table I: Polyplexes size and charge

polymer	DNA ($\mu\text{g/ml}$)	serum (%)	Size (nm)		ζ potential (mV)
			Mean	Width	
His-pLK	10	10	410 \pm 31	102	-9.1 \pm 1.3
		100	165 \pm 2	39	-8.4 \pm 0.4
	5	10	399 \pm 16	76	-9.6 \pm 0.8
		100	156 \pm 46	12	-8.2 \pm 0.7
PEI	10	10	437 \pm 27	78	-8.0 \pm 2.4
		100	168 \pm 55	24	-7.7 \pm 0.6
	5	10	376 \pm 19	69	-7.9 \pm 2.6
		100	110 \pm 32	7	-5.8 \pm 1.3

The size and ζ potential of the polyplexes were determined by Dynamic Laser Scattering using the ZetaSizer 3000. The average values showed are the mean \pm SD of three different measures.

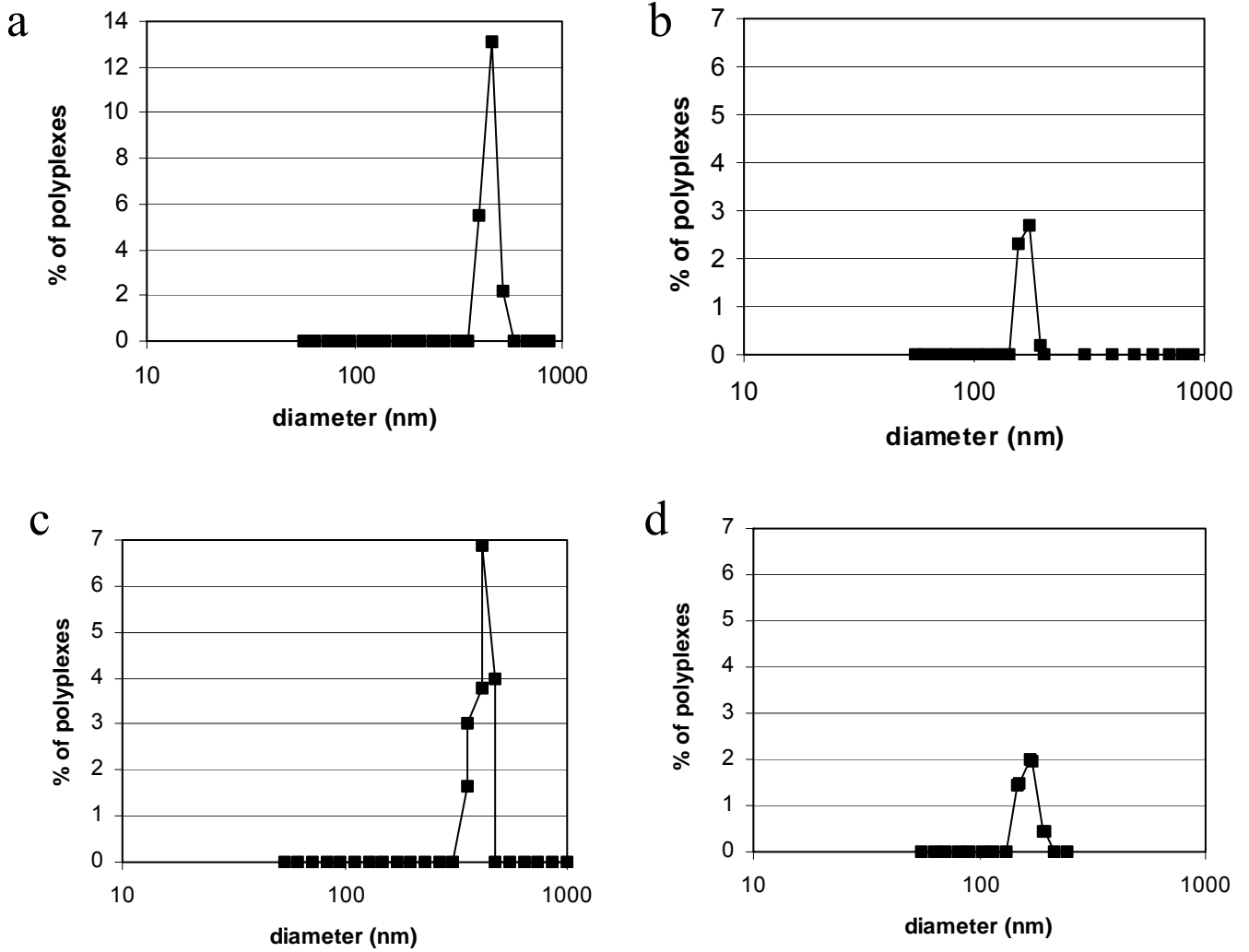


Figure 1: Polyplexes size distribution. (a, b) PEI- and (c, d) His-polyplexes (10 $\mu\text{g/ml}$ DNA) in 10% serum (a, c) or in 100% serum (b, d). The size of polyplexes was measured by light scattering.

Polyplexes binding under flow conditions

Time-lapse video microscopy was used to monitor polyplexes binding on the HLMEC monolayer. The passage of fluorescent polyplexes on the cell monolayer was carried out over 30 min in a parallel plate flow chamber connected to an opened flow system, from a reservoir containing polyplexes to a syringe. A key advantage of this system is that the flow is laminar and it offers the ability to apply any shear stress (τ) of interest. The interactions of polyplexes with the cell monolayer were monitored at τ of 0.06 to 2 dyn/cm². Shear stresses of 1 to 3 dyn/cm² correspond to those of venous wall while that of 0.3 to 1 dyn/cm² mimic those found in the blood microvessels. In Figure 2 shown are images of bound polyplexes on the HLMEC monolayer at 0.06 and 1 dyn/cm². PEI-polyplexes appeared to bind more on the cell monolayer than His-polyplexes at 0.06 dyn/cm² (Fig. 2a and 2c). In contrast, there was no significant difference at 1 dyn/cm² (Fig. 2b and 2d). One can notice that there was an apparent heterogeneity in the size of the fluorescent spots. This broad size distribution was not evidenced from the light scattering measurements of polyplexes (Table I). Moreover, the polyplexes size remained stable over the time of the experiments. Therefore, this heterogeneity did not reflect heterogeneity of the size of polyplexes but came from optical artefacts. The pixel area covered by a polyplex can vary dramatically with focus; e.g., particles in sharp focus appeared smaller than the same particle positioned slightly above or below the plane of focus. An automated procedure was used for counting the number of fluorescent polyplexes attached to the cell monolayer.

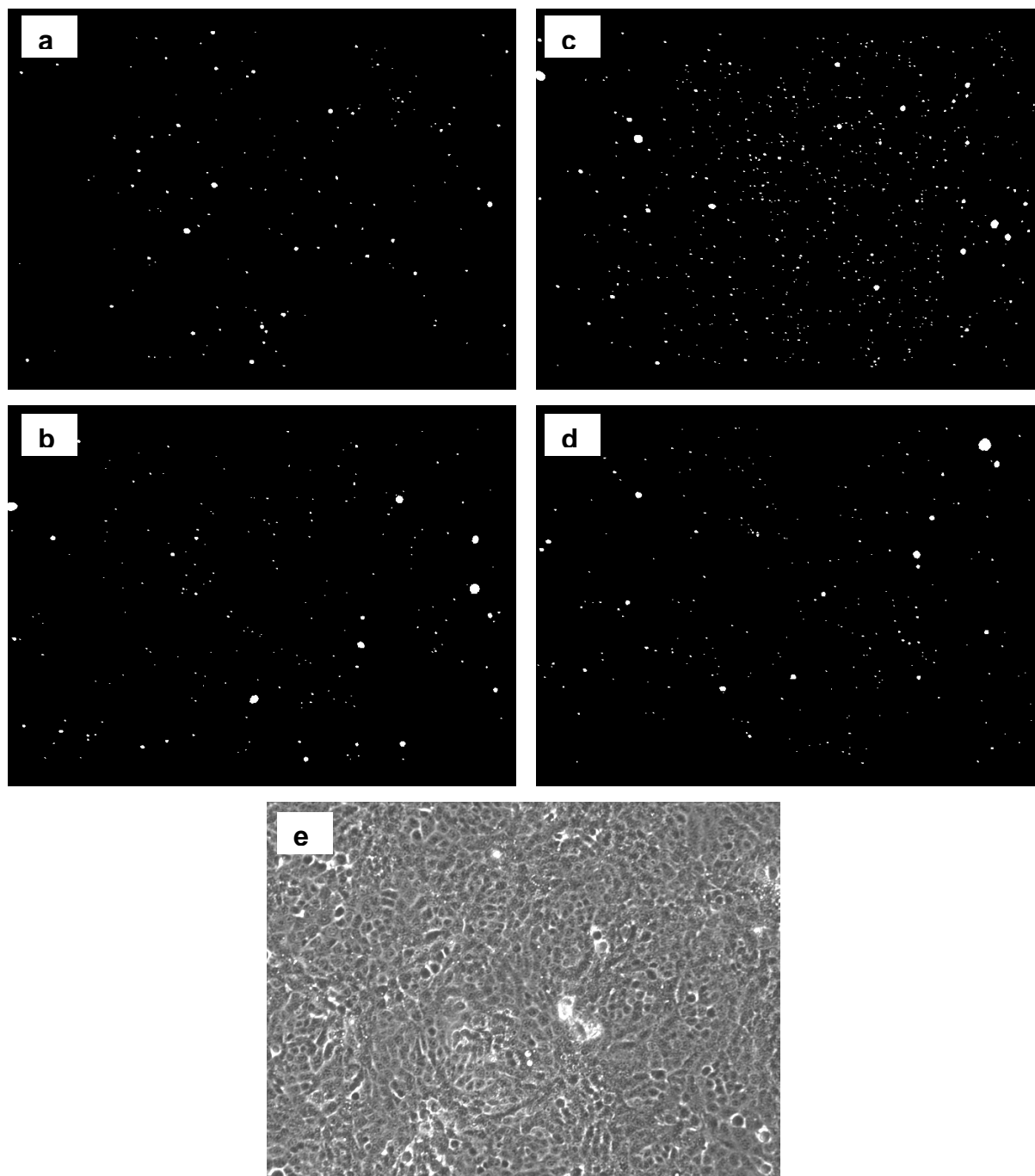


Figure 2: Dynamic binding of polyplexes on the HLMEC monolayer. (a, b) His- and (c, d) PEI- polyplexes (10 $\mu\text{g/ml}$ DNA) in 10% serum were passed for 30 min either at (a, c) 0.06 dyn/cm^2 or (b, d) 1 dyn/cm^2 on the cell monolayer mounted in the flow chamber. (e) phase contrast representative image of the cell monolayer.

When polyplexes binding experiments were conducted with 10 $\mu\text{g/ml}$ DNA in the presence of 10% serum, about 250 ± 50 His-polyplexes/1000 cells were bound on the HLMEC monolayer upon 30 min under a τ ranging from 0.06 to 1 dyn/cm^2 (Fig. 3). The number of His-polyplexes dropped to 90 ± 50 particles/1000 cells when τ reached 2 dyn/cm^2 . Concerning the binding of PEI-polyplexes, it decreased from 800 ± 100 to 300 ± 50 particles when τ increased from 0.06 to 0.3 dyn/cm^2 (Fig. 3). Then, it was constant between 0.3 to 1 dyn/cm^2 and dropped to 120 ± 50 particles under 2 dyn/cm^2 . These results indicate that those polyplexes interacted weakly with the HLMEC monolayer under flow conditions found in venous whilst they were able to bind under those mimicking blood microvessels. PEI-polyplexes adhered 1.5 fold more than His-polyplexes between shear stresses of 0.3 to 2 dyn/cm^2 .

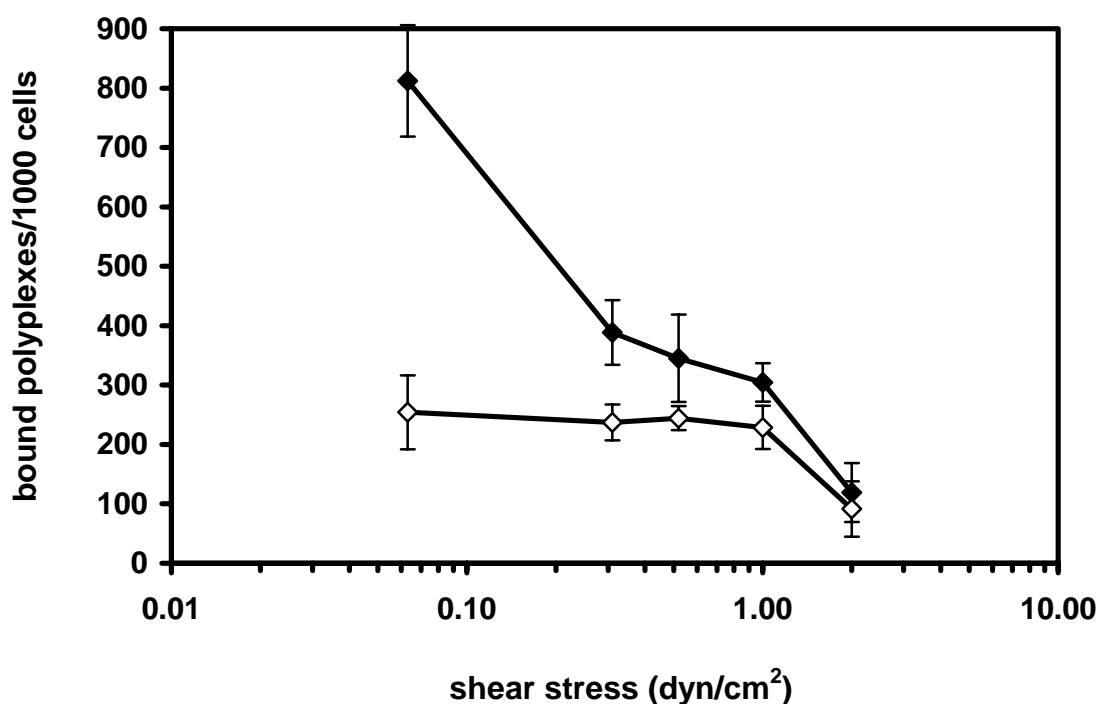


Figure 3 : Effect of shear stress on the binding of His- and PEI-polyplexes. Polyplexes (10 $\mu\text{g/ml}$ DNA) in 10% serum were passed for 30 min under different shear stresses on the HLMEC monolayer mounted in the flow chamber. The binding of His- (\diamond) and PEI- (\blacklozenge) polyplexes was expressed as the number of bound polyplexes per 1000 cells. The average values (mean \pm SD) from three different experiments are shown.

The kinetic binding curves of His- and PEI-polyplexes obtained under various shear stresses are shown in Fig. 4. The number of His-polyplexes bound per 1000 cells under 0.06 to 1 dyn/cm^2 was ~ 150 after 10 min and then slowly rose up to ~ 250 after 30 min. The binding curve recorded under 2 dyn/cm^2 exhibited a similar shape but the number of bound polyplexes was lower (~ 50 and ~ 90 after 10 min and 30 min, respectively) (Fig. 4a). Concerning PEI-polyplexes, three binding levels were observed depending on the shear stress: the highest level was obtained under 0.06 dyn/cm^2 (~ 600 particles after 10 min to ~ 800 particles after 30 min), an intermediate level between 0.3 to 1 dyn/cm^2 (~ 200 particles after 10 min to ~ 300 particles after 30 min) and the lowest level under 2 dyn/cm^2 (~ 50 particles after 10 min to ~ 100 particles after 30 min) (Fig. 4b). One can observe that PEI- and His-polyplexes have close binding profiles except for the binding recorded at 0.06 dyn/cm^2 .

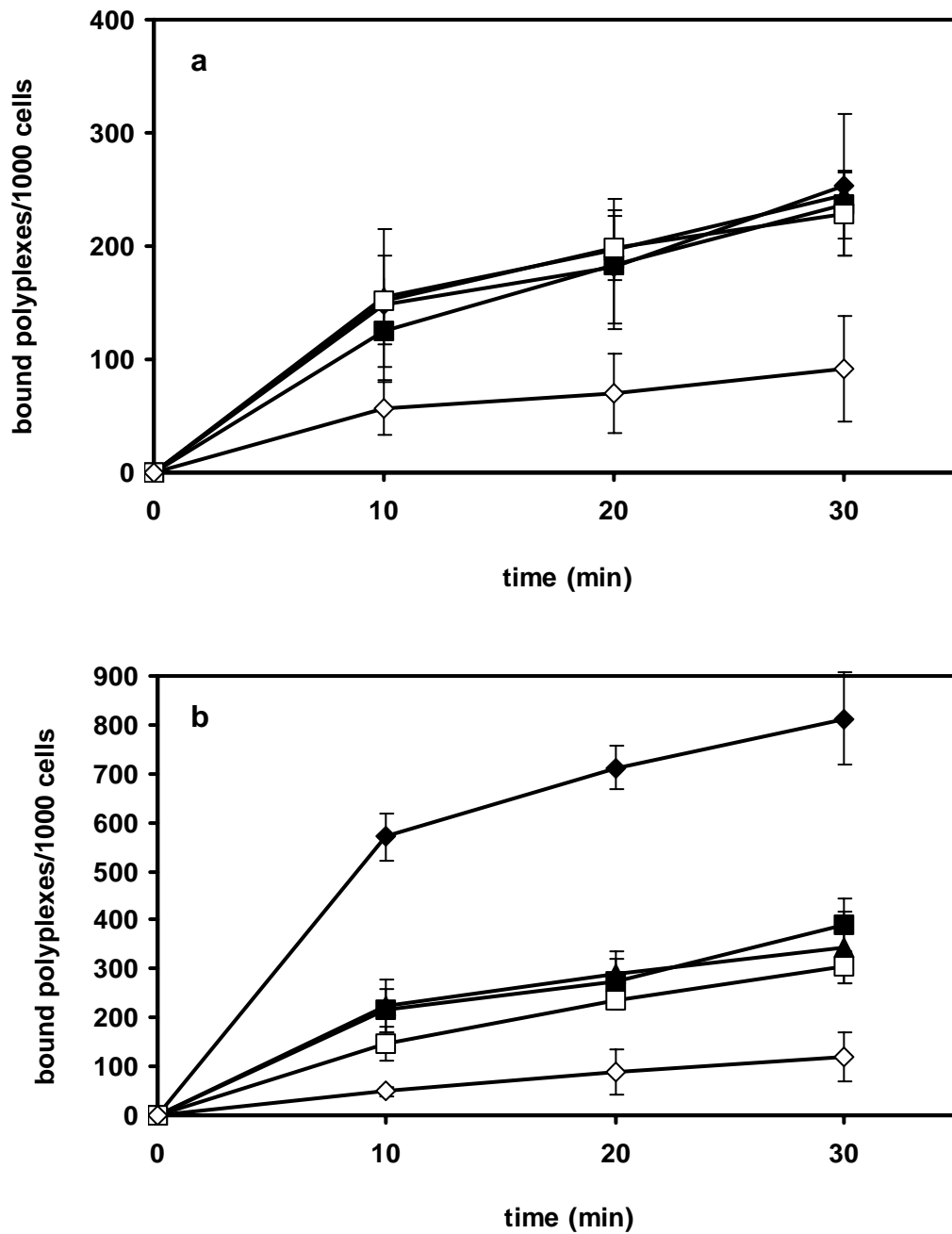


Figure 4 : Kinetic of the polyplexes binding. (a) His- and (b) PEI-polyplexes (10 $\mu\text{g/ml}$ DNA) in 10% serum were passed over 30 min under a shear stress of either (\blacklozenge) 0.06 dyn/cm^2 , (\blacksquare) 0.3 dyn/cm^2 , (\blacktriangle) 0.5 dyn/cm^2 , (\square) 1 dyn/cm^2 or (\diamond) 2 dyn/cm^2 on the HLMEC monolayer mounted in the flow chamber. The average values (mean \pm SD) from three different experiments are shown.

Similar experiments were conducted in the presence of 100% serum (Fig. 5). The binding of His-polyplexes was weakly affected under low shear stresses while it was reduced by 37% under 1 and 2 dyn/cm² (Fig. 5a). By contrast, the number of adhered PEI-polyplexes decreased by 37% in the presence of 100% serum and this occurred even under 0.06 dyn/cm² (Fig. 5b). It is known that the shear stress increases with the medium viscosity whilst the sedimentation velocity, the Brownian motion and the translational velocity decrease²⁴. According to the fact that the polyplexes size was 3-fold smaller in 100% serum than in 10% (Table I) and the higher viscosity of medium containing 100% serum, it is not surprising that the polyplexes binding was reduced in 100% serum. Furthermore, it cannot be excluded that the presence of higher amount of serum proteins could lower polyplexes-membrane interaction. At 5 µg/ml of DNA in the presence of 10% serum, the shape of the binding curves for His- and PEI- was similar to that observed at 10 µg/ml. The number of bound polyplexes measured at 5 µg/ml of DNA under 0.5 dyn/cm² in the presence of 10% and 100% serum presented in Fig.6, is representative of data found under the other shear stresses. The binding was 40% and 75% of that obtained in the presence of 10% serum for His- and PEI-polyplexes, respectively. This was in contrast to that observed at 10 µg/ml DNA.

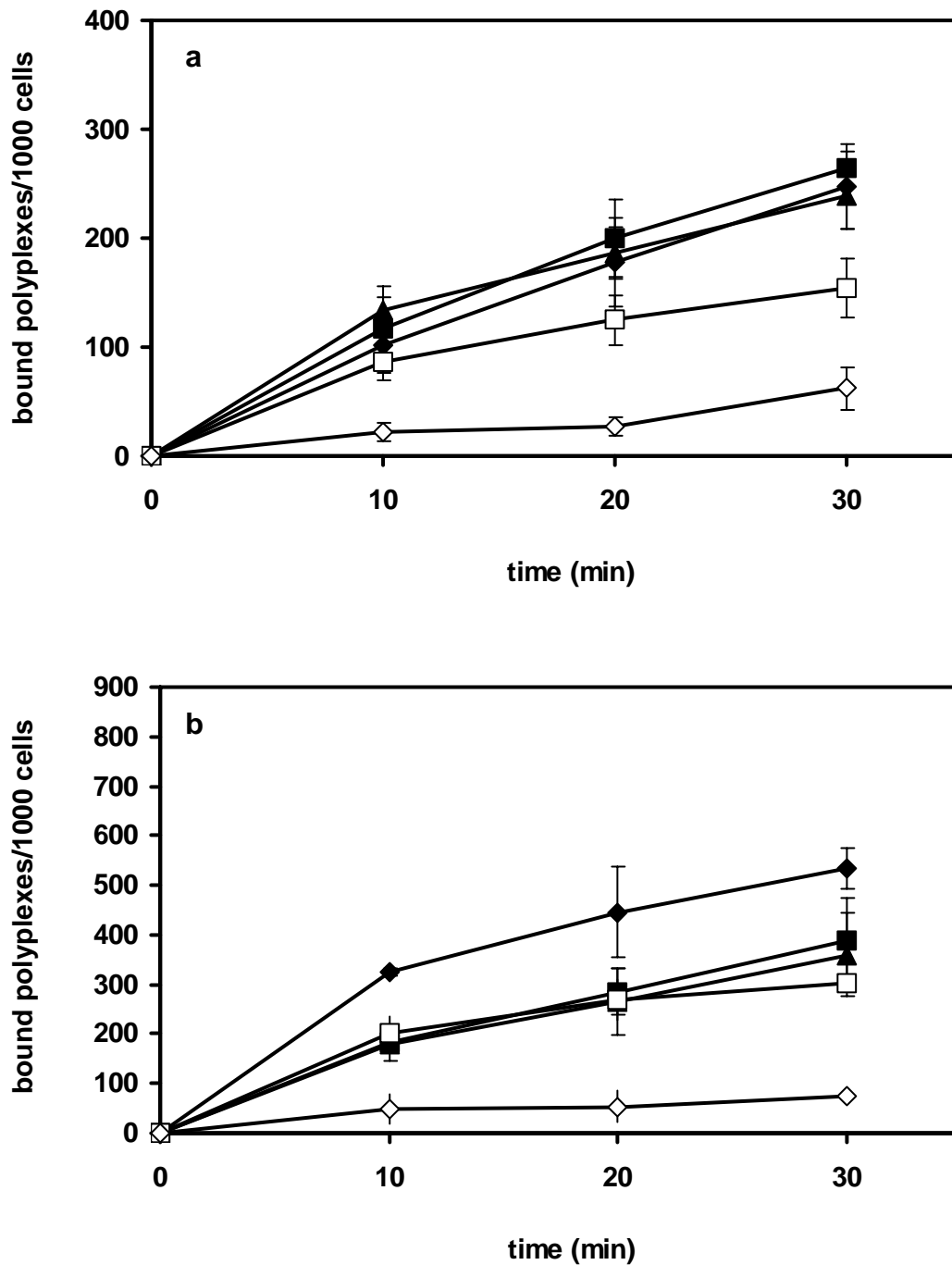


Figure 5 : Effect of the serum on the kinetic binding of polyplexes. (a) His- and (b) PEI-polyplexes (10 $\mu\text{g/ml}$ DNA) in 100% serum were passed over 30 min under a shear stress of either (◆) 0.06 dyn/cm^2 , (■) 0.3 dyn/cm^2 , (▲) 0.5 dyn/cm^2 , (□) 1 dyn/cm^2 or (◇) 2 dyn/cm^2 on the HLMEC monolayer mounted in the flow chamber. The average values (mean \pm SD) from three different experiments are shown.

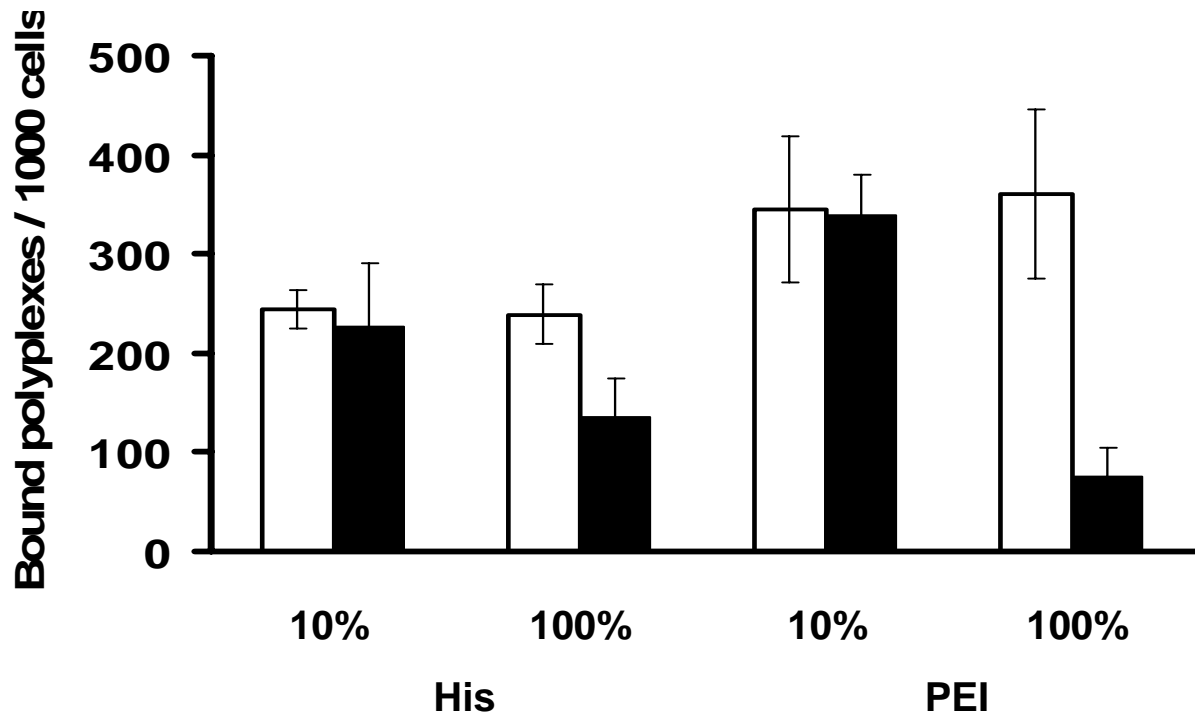


Figure 6 : Effect of DNA concentration on the binding of His- and PEI-polyplexes. Polyplexes at either 10 µg/ml DNA (white bar) or 5 µg/ml (black bar) in 10% or 100% serum were passed for 30 min under a shear stress of 0.5 dyn/cm² on the HLMEC monolayer mounted in the flow chamber. The average values (mean ± SD) from three different experiments are shown.

Polyplexes binding under static and dynamic conditions

New sets of experiments were conducted to correlate polyplexes binding data measured under dynamic conditions with those obtained usually under static one. For this purpose, the binding experiment was performed in either the flow chamber in the absence of flow or on a 2 cm² glass slide in a standard 24 wells tissue culture plate. The difference between the flow chamber and the 2 cm² well consisted of a fluid depth of 250 μm and of 1500 μm, respectively. Thus, the amount of polyplexes present above the cell monolayer was higher when the fluid depth was 1500 μm than 250 μm at the same DNA concentration. In standard 2 cm² well, the binding of polyplexes at 10 μg/ml DNA in the presence of 10% serum was ~2.5-fold higher than in the flow chamber (Table II). The difference was less significant in the presence of 100% serum. However, data were similar at 5 μg/ml DNA whatever the amount of serum.

It is noticeable that more polyplexes (2-fold) adhered in the flow chamber at shear stresses of 0.3 dyn/cm² and 1 dyn/cm² than in the absence of flow (Table II). This was due to the fact that the amount of polyplexes available in the medium was lowered upon their binding on the cell monolayer in the absence of flow, while it was kept constant under flow. In contrast, the balance between the sedimentation velocity and the flow rate was not able to increase the binding on the cell monolayer under 2 dyn/cm² despite the constant amount of polyplexes in the flow chamber.

Table II : Polyplexes binding on the HLMEC monolayer under static and flow conditions.

Polymer	DNA ($\mu\text{g/ml}$)	Serum (%)	Number of bound polyplexes / 1000 cells				
			Shear stress (dyn/cm^2)				
			Fluid depth (μm)				
			1500	250	0	0	0.3
His-pLK	10	10	318 \pm 21	125 \pm 11	244 \pm 20	229 \pm 36	91 \pm 47
		100	154 \pm 25	126 \pm 52	264 \pm 16	154 \pm 27	62 \pm 19
	5	10	142 \pm 33	115 \pm 27	224 \pm 31	210 \pm 33	160 \pm 27
		100	131 \pm 24	68 \pm 23	156 \pm 19	135 \pm 16	93 \pm 31
PEI	10	10	452 \pm 51	172 \pm 49	389 \pm 55	304 \pm 32	119 \pm 49
		100	224 \pm 22	180 \pm 8	388 \pm 85	301 \pm 13	81 \pm 7
	5	10	226 \pm 15	188 \pm 17	367 \pm 60	205 \pm 46	155 \pm 7
		100	116 \pm 44	94 \pm 10	81 \pm 39	87 \pm 6	54 \pm 5

Polyplexes binding on the HLMEC monolayer was measured either under flow or static conditions in the flow chamber with a fluid depth of 250 μm . It was also measured under static conditions upon polyplexes incubation with the cell monolayer grown on a 2 cm^2 glass slide in a standard 24 wells tissue culture plate with a fluid depth of 1500 μm . The cell monolayer was incubated for 30 min with polyplexes. The average values (mean \pm SD) from three different experiments are shown.

Enhanced binding of JETPEI-HUVEC polyplexes under dynamic conditions.

The above data indicate that the binding of PEI-polyplexes on the HLMEC monolayer was not very efficient under flow conditions mimicking those found in the microvessels. Such poor binding comes probably from the absence of high affinity between polyplexes and the cell membrane. jetPEITM-HUVEC, a tetraglucose-conjugated PEI derivative, has been reported to bind and to transfect HUVEC primary human endothelial cells more efficiently than jetPEITM ²⁵. We found that PEI-HUVEC-polyplexes were 10-fold more efficient than PEI-polyplexes to transfect HLMEC cells (data not shown). We wondered if such polyplexes surface modification could increase their binding on HLMEC monolayer under flow conditions. PEI-HUVEC-polyplexes exhibited size (436 ± 12 nm) and ζ potential (-9.7 ± 2 mV) similar to that of PEI-polyplexes. Binding experiments were conducted over 30 min under 0.5 dyn/cm^2 . As shown in Figure 7, the number of bound particles augmented by 300% compared to PEI-polyplexes as soon as 10 min passage. The sedimentation velocity of non-targeted polyplexes is the main parameter that governs their interactions with the surface of the cell monolayer. Under flow, there is a complex balance between forces arising from hydrodynamic shearing effects and the strength of the adhesive bond. As expected, firm polyplexes adhesion on EC through specific molecular recognition can increase the interaction strength of polyplexes with the membrane minimizing the negative effect of the flow rate.

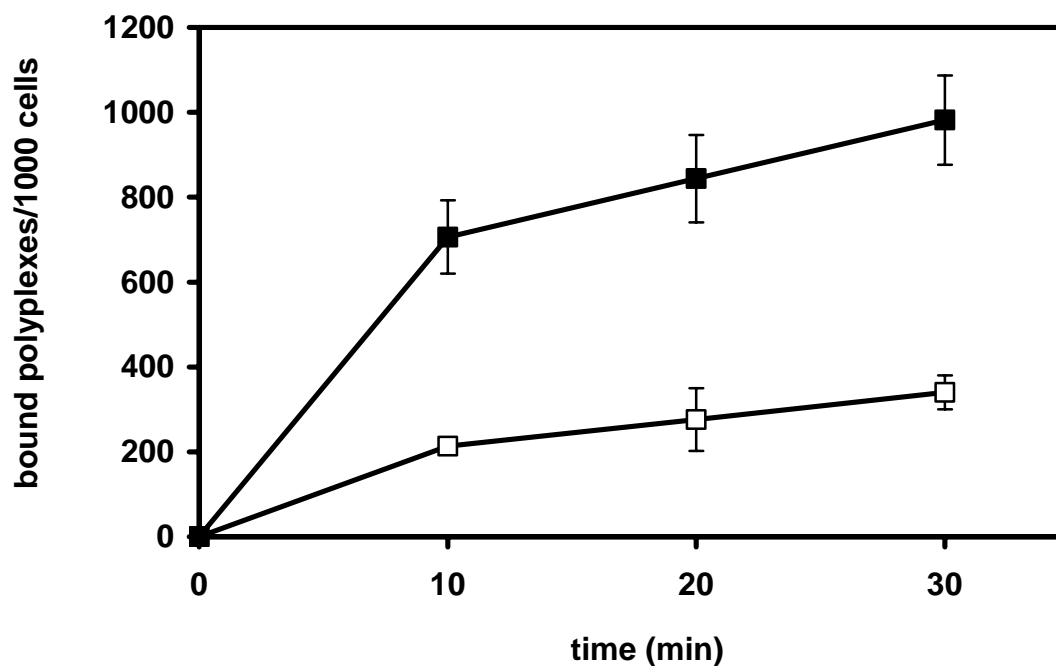


Figure 7 : Enhanced binding of targeted-polyplexes under dynamic conditions. (□) PEI- and (■) PEI-HUVEC-polyplexes were passed during 30 min on the HLMEC monolayer. Experiments were performed with 10 $\mu\text{g/ml}$ DNA in 10% serum at a shear stress of 0.5 dyn/cm^2 . The average values (mean \pm SD) from three different experiments are shown.

DISCUSSION

Systemic and specific gene therapy with polyplexes has still a long way before combining access and transfection efficacy in organs separated from blood flow by tight endothelia. Blood vessels are constantly exposed to hemodynamic forces in the form of cyclic stretch and shear stress due to the pulsatile nature of the blood flow. To date, polyplexes interaction with EC in the blood circulation and their transendothelial transport are still poorly understood. Thus, conducting binding experiments under flow is the best appropriate way to evaluate polyplexes recognition by EC. In the present work, we realized studies of polyplexes-membrane interaction by fluorescence video microscopy under flow conditions. For this purpose, the polarized HLMEC monolayer was submitted to a range of shear stresses (τ) and the number of bound polyplexes was determined. In the absence of flow, the interactions of these virus-like particles with the surface of the cell monolayer are mainly governed by their sedimentation velocity and their Brownian motion²⁶. Although, their translational velocity induced by the flow modifies their sedimentation velocity. Therefore, there is a complex balance between forces arising from hydrodynamic shearing effects, the particle sedimentation velocity and the strength of the polyplexes-membrane interaction. Our data indicate that the polyplexes arrest on the cell surface depends on the particle size and the shear stress strength. Under a τ mimicking that of microvessels (0.3 - 1 dyn/cm²), they were able to bind to the HLMEC monolayer whilst they hardly adhered at a higher τ as that of venous wall (2 dyn/cm²). The number of polyplexes bound on the cell monolayer was relatively low (about 2 to 3 polyplexes per 10 cells) because of their coating with serum proteins which prevented their aggregation and reduced their electrostatic interaction with the plasma membrane. Kinetic curves showed that the number of bound polyplexes increased weakly (1.5-fold) between 10 min and 30 min. This suggested that the attachment of polyplexes was very strong, but nearly saturated after 10 min so that the relative small increase upon 30 min was due to a small number of binding sites available. There was probably a membrane domain heterogeneity for polyplexes attachment. Indeed, the surface area of all cells was not similarly exposed overall the cell monolayer.

Furthermore, it is known that when EC are subjected to a shear stress resulting from the blood flow, they can convert the mechanical stimuli to signals that have an influence on several cellular functions²⁷⁻²⁹. So, HLMEC cells in the monolayer may respond differentially to the shear stress strength causing heterogeneity in their ability to bind polyplexes. In addition, shear stress has been found to increase the fluidity of membrane lipid bilayer through several mechanosensors (for a review see³⁰). Such variations could also affect the binding of polyplexes.

The amount of serum present in the medium affected negatively the binding of polyplexes and this was amplified at low DNA concentration. In 100% serum, polyplexes exhibited a 3-fold smaller size due to the coating with serum proteins preventing their aggregation at physiological salt concentration. Consequently, their sedimentation velocity was reduced according to the Stokes' law and thus polyplexes passing close to the cell membrane had a better chance to be attached to the cell monolayer. This binding reduction could also come from the coating of the monolayer surface with serum proteins masking some potential binding domains. No dramatic effect of size reduction was observed at 10 μ g/ml DNA in the presence of 100% serum because the polyplexes number in the flow circulation was probably much more greater than that of the membrane domains liable to interact with them. By contrast, it was lower at 5 μ g/ml DNA and polyplexes bound rarely to the monolayer.

To date, only one recent study concerning the delivery of lipoplexes under flow conditions has been published³¹. Harris and Giorgio have addressed the influence of the flow rate on lipoplexes delivery by using theoretical calculations. They have also carried out

experiments with ECV-304 and HeLa cells. Their system was a closed one in which the same lipoplexes solution circulate over 4h in the flow chamber. So, as lipoplexes bound on the cells, their concentration in the circulation decreased. In contrast, polyplexes passed only once in our system, maintaining their concentration constant. They showed that addition of flow increased the delivery of lipoplexes up to a shear stress limit of 9.7 dyn/cm^2 . Their data indicate also that the lipoplexes delivery was higher under flow conditions than under static ones. Our data are in line with those observations, despite the shorter time (30 min) and lower shear stresses used.

Some *in vivo* studies have reported the transfection of lungs after a systemic administration of polyplexes³²⁻³⁶. Polyplexes are known to stop their course in small vessels after a systemic administration often owed aggregation and especially in the lungs, the first capillary bed encountered in murine species^{37, 38}. Therefore, particles stagnation in small vessels could explain the better transfection of lung than other organs. The biodistribution of different types of complexes in the lung indicated that other factors than their size might be involved in the efficacy of the gene transfer³⁹. For example, DNA complexed with a linear PEI (PEI of 22kDa) or a branched PEI (PEI of 25kDa) was differently deposited in the lung despite their similar size. Polyplexes were detected and the transfection was effective in the lungs with the former whereas neither polyplexes retention nor effective transfection were obtained with the latter.

Endothelial cell types vary considerably between tissues (e.g. lung capillaries being leaky, while brain and probably muscular capillaries being pretty tight) and furthermore, the organ specificity of endothelium has been demonstrated⁴⁰⁻⁴². Endothelial cells biology indicates that they are extremely sensitive to their environment including inflammation, tumour and metastasis. Amongst the environmental effectors are cytokines and chemokines which very efficiently modulate the cell surface expression of various receptors and adhesion molecules^{43, 44}. Consequently depending on the EC environmental conditions, membrane receptors could be expressed or not varying the polyplexes binding. So, conducting polyplexes binding studies as function of the EC origins and environmental conditions will truly give useful information for the selection of EC ligands to elaborate smart vectors for clinical applications.

The addition of a signal molecule such as tetraglucose residues on PEI led to a 3-fold enhancement of the number of polyplexes bound onto the HLMEC monolayer under flow conditions. This means that the addition of a ligand having a high affinity for endothelial cells will better improve polyplexes attachment and targeting. However, more than one signal molecule would be necessary to promote a strong attachment of polyplexes. In this field, strategies mimicking lymphocyte homing or virus infection could be investigated. Different molecules including chemokines or lipid chemoattractants are implicated in the lymphocyte homing on the vascular endothelium in a stepwise manner^{43, 45}. These ligands are presented on the apical surface of EC where they can induce a firm adhesion as well as a remodelling of the cytoskeleton of the recruited leukocytes. In the case of the adenovirus serotype 5 (Ad5) infection, virus adhesion and internalization involve two types of signal located on the capsid fiber and penton proteins. The fiber docks to a non-internalizing cell surface protein termed the Coxsackievirus-Adenovirus Receptor (CAR), followed by penton binding to integrins, triggering integrin-mediated endocytosis of the virus^{46, 47}. Such mechanisms could be exploited for polyplexes recognition and internalization. Recently, the Ad5 fiber coupled to polylysine mediated efficient transfection in epithelial cell lines⁴⁸. When the goal is to transfect underlying tissues, polyplexes must cross endothelial layers. The transendothelial passage can occur either by transcytosis or fenestration. In both cases, one of the signal molecules must also promote the polyplexes passage through the vascular compartment to the interstitial space. EC exposed to exogenous chemokines are able to bind them on their luminal or abluminal side and to transport them by transcytosis to the opposite side of the cells. These

properties make chemokines privileged molecules to target polyplexes to the transcytosis pathway in EC. Anyhow, firm polyplexes adhesion on EC through specific molecular recognition is crucial to increase interaction strength with the membrane minimizing the negative effect of the flow rate.

The studies on adhesion of particles under flow are just in the beginning in gene delivery field. The vasculature models must be improved to get further knowledge. Some adaptations could be set up to improve our system model. For example, a pulsated flow corresponding to the one in microvessels could be introduced. Moreover, tissue engineering science can supply more sophisticated systems as a model with microvessels having tubular form¹⁵. Nevertheless, the set-up used in this study is appropriate to assess the physical characteristics of polyplexes adhesion and the selection of ligands to target polyplexes on EC. These investigations will strongly advance the design of new vectors. It is clear that these *in vitro* studies have to be validated with *in vivo* experiments. Such integrative approaches will provide new insights into the reactivity of EC from various organs and will give useful clues for the selection of EC ligands to elaborate smart vectors for clinical applications.

MATERIALS AND METHODS

Cells and cells culture

The human lung microvascular endothelial cell line (HLMVEC) was immortalized HS888Lu cells (ATCC CCL211, ATCC Rockville, MD) from normal lung tissue of a patient with lung osteosarcoma metastasis¹⁹. Cells (10^5) were plated on tissue culture dish and grown in 10 ml OptiMEM (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplemented with 2 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (AbCys, Paris, France), 2 mM L-glutamine (Life Technologies) and 100 units/ml penicillin (Life Technologies) and 100 μ g/ml streptomycin (Life Technologies). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere in the presence of 5% CO₂. On day 5, cells were harvested by treating with trypsin (PBS with 0.02% (w/v) EDTA and 2.5 μ g/ml trypsin) at 37°C for 10 min. Cells were free from mycoplasma as evidenced by bis-benzimidazole staining⁴⁹.

Plasmid and polymers

pSV2Luc (5 kb) was an expression plasmid encoding the firefly luciferase gene under control of the simian virus-40 Large T antigen promoter⁵⁰. pSV2Luc was labelled with YOYO-1 (491/509, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) by mixing for 30 min at 20°C the bis-intercalating molecule at a ratio of one dye molecule for 300 base pairs. Then, the mixture was dialyzed overnight at 4°C. Histidine-rich polylysine (His-pLK, Mw = 70400) prepared as previously described¹⁸ was a poly-L-lysine of 190 lysyl residues with 50% of them substituted with histidyl residues. Jet-PEITM and Jet-PEITM-HUVEC were from Polyplus transfection S.A.S. (Illkirch, France).

Polyplexes

His-Polyplexes were prepared by adding 15 μ g of His-pLK in 30 μ l HEPES buffer 10 mM, pH 7.4 to 5 μ g plasmid in 70 μ l of same buffer at a polymer/DNA weight ratio of 3:1 and a positive/negative charge (N/P) ratio of 2.7. The solution was mixed for 4 s and stood for 30 min at 20°C. PEI-polyplexes were prepared by adding 10 μ l JetPEITM (7.5 nM nitrogen) solution in 50 μ l H₂O containing 5% glucose to 5 μ g plasmid in 45 μ l H₂O, 5% glucose at a polymer/DNA weight ratio of 2:1 (N/P ratio of 5). The solution was mixed for 4 s and stood for 30 min at 20°C. The polyplexes solutions were adjusted to the required volume with OptiMEM supplemented with FCS before experience. The size and ζ potential of the

polyplexes were determined by using the ZetaSizer 3000 (Malvern Instruments, Orsay, France) as described⁵¹.

Cells monolayer formation

The HLMEC monolayer was obtained by seeding $2 \cdot 10^5$ cells on a polystyrene cell culture slide (Nunc brand, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) pre-coated for 20 min at 37°C with MEM containing fibronectin (0.01 mg/ml), collagen (0.03 mg/ml) and bovine serum albumin (BSA) (0.1 mg/ml). Cells were grown for 72 h at 37°C to reach confluence in OptiMEM supplemented with 2 % heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine and 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. The endothelial cells monolayer was characterized by tight junctions formation evidenced by a confocal microscopy analysis upon a ZO-1 (Zonula Occludens-1) immunostaining performed as previously described⁹.

Polyplexes adhesion under dynamic conditions

A parallel flow chamber connected to an opened flow system from a reservoir containing polyplexes to a syringe constituted our flow system. In this model, the flow was laminar. Slides of HLMEC monolayer were mounted on a Cell Adhesion Flow Chamber (CAF-10, Immunetics, Boston, MA, USA) and held in place by vacuum. The system was connected to a precise infusion/withdrawal pump (model PHD 2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) for controlling the flow of the YOYO-1-polyplexes solution through the perfusion chamber. The inlet of the perfusion chamber was connected to the reservoir containing the polyplexes solution *via* a three-way valve. The outlet was connected to the pump. The flow rate (Q) required to give the desired wall shear-stress (τ) was calculated from the dimension of the perfusion chamber and the viscosity of the medium as follows: $Q = (\tau w h^2) / 6\mu$ where μ is the viscosity of the medium and w and h are the internal width (5.5 mm) and height (250 µm) of the perfusion chamber. For example, a Q of 10 µl.s⁻¹ provides a τ of 2 dyn/cm². Viscosity of the media was determined using a rheometer AR2000 (TA Instruments, New Castle, USA). Measurements were taken at 20°C over a range of shear rates. Pure OptiMEM medium exhibited a Newtonian behaviour and its viscosity was close to the value for water. The viscosities of OptiMEM supplemented with either 10% or 100 % FCS were $1.2 \cdot 10^{-2}$ and $1.6 \cdot 10^{-2}$ dyn-s/cm², respectively.

Image acquisition and data analysis

The binding of polyplexes on HLMEC monolayer was observed under an inverted microscope (Axiovert 200M; Zeiss, Germany) using the Plan-NeoFluar 10X/0.30 Ph1 (DIC I) objective. The microscope was connected through an AxioCam MRm (Zeiss) to a monitor. The experiments were processed with AxioVision 4.3 software. The number of polyplexes bound to the cell monolayer was counted on three different slides and expressed as the number of bound polyplexes per 1000 cells. All images acquired under dynamic or static conditions were analysed using the Visilog 6.3 software (Noesis, Les Ulis, France). Images were analysed in an automated procedure using a customized program macro.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Association Française contre les Myopathies and Vaincre la Mucoviscidose. E.M receives a fellowship from Ligue Nationale contre le Cancer.

REFERENCES

1. Neu M, Fischer D, Kissel T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med* 2005; **7**: 992-1009.
2. Midoux P, Pichon C. Peptide-based gene delivery systems. Pharmaceutical perspectives of nucleic acid-based therapeutics 2002, RI Mahato SW Kim Eds., Taylor and Francis: pp. 334-366.
3. Zuber G *et al.* Towards synthetic viruses. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; **52**: 245-253.
4. Youdim KA, Avdeef A, Abbott NJ. In vitro trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. *Drug Discov Today* 2003; **8**: 997-1003.
5. Coisne C *et al.* Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest* 2005; **85**: 734-746.
6. Garberg P *et al.* In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicol In Vitro* 2005; **19**: 299-334.
7. Cecchelli R *et al.* In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; **36**: 165-178.
8. Tewes BJ, Galla HJ. Lipid polarity in brain capillary endothelial cells. *Endothelium* 2001; **8**: 207-220.
9. Mennesson E *et al.* Transfection efficiency and uptake process of polyplexes in human lung endothelial cells: a comparative study in non-polarized and polarized cells. *J Gene Med* 2005; **7**: 729-738.
10. Ohura N *et al.* Global analysis of shear stress-responsive genes in vascular endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 2003; **10**: 304-313.
11. Dekker RJ *et al.* Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2). *Blood* 2002; **100**: 1689-1698.
12. Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM. Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiol Genomics* 2002; **9**: 27-41.
13. Wasserman SM *et al.* Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress. *Physiol Genomics* 2002; **12**: 13-23.
14. Phelps JE, DePaola N. Spatial variations in endothelial barrier function in disturbed flows in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; **278**: H469-476.
15. Neumann T, Nicholson BS, Sanders JE. Tissue engineering of perfused microvessels. *Microvasc Res* 2003 ; **66**: 59-67.
16. Ueda A *et al.* Effect of shear stress on microvessel network formation of endothelial cells with in vitro three-dimensional model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; **287**: H994-1002.
17. Abdallah B *et al.* A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 1996; **7**: 1947-1954.
18. Midoux P, Monsigny M. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconj Chem* 1999; **10**: 406-411.
19. Kieda C *et al.* New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes. *Endothelium* 2002; **9**: 247-261.
20. Brenner H. The slow motion of a sphere through a viscous fluid towards a plane surface. *Chem Eng Sci* 1961; **16**: 242-251.
21. Goldman A, Cox R, Brenner H. Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall - I. Motion through a quiescent fluid. *Chem Eng Sci* 1967; **22**: 637-651.

22. Goldman A, Cox R, Brenner H. Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall - II. Couette flow. *Chem Eng Sci* 1967; **22**: 653-660.
23. Kim D, Cha W, Beissinger R. Mass transport of macromolecules in sheared suspension to surfaces. *J Colloid Interf Sci* 1993; **159**: 1-8.
24. Danov K, Aust R, Durst F, Lange U. Influence of the surface viscosity on the hydrodynamic resistance and surface diffusivity of a large Brownian particle. *J Colloid Interf Sci* 1995; **175**: 36-45.
25. Zaric V *et al.* Effective polyethylenimine-mediated gene transfer into human endothelial cells. *J Gene Med* 2004; **6**: 176-184.
26. Chuck AS, Clarke MF, Palsson BO. Retroviral infection is limited by Brownian motion. *Hum Gene Ther* 1996; **7**: 1527-1534.
27. Butler PJ, Norwich G, Weinbaum S, Chien S. Shear stress induces a time- and position-dependent increase in endothelial cell membrane fluidity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **280**: C962-969.
28. Butler PJ *et al.* Rate sensitivity of shear-induced changes in the lateral diffusion of endothelial cell membrane lipids: a role for membrane perturbation in shear-induced MAPK activation. *FASEB J* 2002; **16**: 216-218.
29. Haidekker MA, L'Heureux N, Frangos JA. Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: a study with DCVJ fluorescence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; **278**: H1401-1406.
30. Li YS, Haga JH, Chien S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech* 2005; **38**: 1949-1971.
31. Harris SS, Giorgio TD. Convective flow increases lipoplex delivery rate to in vitro cellular monolayers. *Gene Ther* 2005; **12**: 512-520.
32. Goula D *et al.* Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther* 1998; **5**: 1291-1295.
33. Goula D *et al.* Rapid crossing of the pulmonary endothelial barrier by polyethylenimine/DNA complexes. *Gene Ther* 2000; **7**: 499-504.
34. Wiseman JW, Goddard CA, McLelland D, Colledge WH. A comparison of linear and branched polyethylenimine (PEI) with DCChol/DOPE liposomes for gene delivery to epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther* 2003; **10**: 1654-1662.
35. Orson FM *et al.* Gene delivery to the lung using protein/polyethylenimine/plasmid complexes. *Gene Ther* 2002; **9**: 463-471.
36. Trubetskoy VS *et al.* Recharging cationic DNA complexes with highly charged polyanions for in vitro and in vivo gene delivery. *Gene Ther* 2003; **10**: 261-271.
37. Chollet P, Favrot MC, Hurbin A, Coll JL. Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med* 2002; **4**: 84-91.
38. Verbaan FJ *et al.* The fate of poly(2-dimethyl amino ethyl)methacrylate-based polyplexes after intravenous administration. *Int J Pharm* 2001; **214**: 99-101.
39. Bragonzi A *et al.* Biodistribution and transgene expression with nonviral cationic vector/DNA complexes in the lungs. *Gene Ther* 2000; **7**: 1753-1760.
40. Craig LE, Spelman JP, Strandberg JD, Zink MC. Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology. *Microvasc Res* 1998; **55**: 65-76.
41. Butcher EC, Scollay RG, Weissman IL. Organ specificity of lymphocyte migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules. *Eur J Immunol* 1980 ; **10**: 556-561.
42. Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 2002; **16**: 1-4.

43. Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**: 336-341.
44. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995; **57**: 827-872.
45. Sallusto F, Mackay CR. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. *Curr Opin Immunol* 2004 ; **16**: 724-731.
46. Bergelson JM *et al.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; **275**: 1320-1323.
47. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993; **73**: 309-319.
48. Rentsendorj A *et al.* The Ad5 fiber mediates nonviral gene transfer in the absence of the whole virus, utilizing a novel cell entry pathway. *Gene Ther* 2005; **12**: 225-237.
49. Chen TR. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res* 1977; **104**: 255-262.
50. Brasier AR, Tate JE, Habener JF. Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *Biotechniques* 1989; **7**: 1116-1122.
51. Bello Roufai M, Midoux P. Histidylated polylysine as DNA vector: elevation of the imidazole protonation and reduced cellular uptake without change in the polyfection efficiency of serum stabilized negative polyplexes. *Bioconjug Chem* 2001; **12**: 92-99.

C| Conclusion.

Pour évaluer le comportement des polyplexes dans un flux, nous avons quantifié leur fixation sur une monocouche de cellules endothéliales microvasculaires par vidéo-microscopie. Cette quantification a été réalisée pour examiner l'influence des contraintes de cisaillement, de la concentration en ADN et de la quantité de sérum dans le milieu sur l'attachement des polyplexes PEI et pLK-His.

Les résultats montrent que la fixation des polyplexes sur les cellules HLMEC dépend de leur taille, des forces de cisaillement et de la quantité de sérum. Pour des contraintes de cisaillement présentes dans des microvaisseaux c'est à dire entre 0.06 et 1 dyn/cm^2 , l'attachement des polyplexes est plus important que dans des conditions rencontrées dans les veines ($> 1 \text{ dyn/cm}^2$). Cependant la fixation des polyplexes PEI est légèrement plus élevée que celle des polyplexes pLK-His. A une concentration d'ADN de $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$, l'adhésion est plus faible en présence de 100% sérum qu'avec 10% sérum car les polyplexes sont plus petits et ont une vitesse de sédimentation plus faible. De plus, la viscosité plus importante du milieu peut aussi agir négativement sur la vitesse de sédimentation. Cette diminution de l'attachement n'est pas observée pour une concentration d'ADN plus élevée parce que le nombre de polyplexes doit être largement supérieur au nombre de sites d'adhésion possibles sur la monocouche.

Les résultats montrent également que l'adhésion des polyplexes lorsque les forces de cisaillement sont entre 0.06 et 1 dyn/cm^2 est supérieure à leur fixation en condition statique. L'adhésion des polyplexes en condition statique diminue leur concentration dans la chambre alors qu'entre 0.06 et 1 dyn/cm^2 , le flux apporte de nouveaux polyplexes dans la chambre. Leur vitesse de sédimentation est suffisamment élevée pour favoriser leur adhésion pendant leur temps de passage dans la chambre. Pour des contraintes de cisaillement de 2 dyn/cm^2 , l'adhésion des polyplexes est plus faible qu'en condition statique car la vitesse du flux diminue leur temps de résidence dans la chambre. Il existe donc une balance entre la vitesse de sédimentation et la vitesse du flux.

Un ligand spécifique des cellules endothéliales est capable d'augmenter la fixation des polyplexes. L'attachement des polyplexes formés avec de la PEI conjuguée à un tétraglycose plus spécifique vis à vis des cellules endothéliales est trois fois plus élevé que l'adhésion des polyplexes PEI.

Notre système de mesure permet de faire varier différents paramètres physiques (contraintes de cisaillement, flux pulsé ou constant) et biologiques (la composition du milieu). Il est, en effet, possible d'utiliser un milieu dont la composition est proche de celle du sang. Bien que notre système ne reflète pas totalement le système vasculaire réel, il permet d'appréhender l'attachement de polyplexes voir de lipoplexes ou de lipopolyplexes formés avec différents vecteurs ciblés ou non dans des conditions de flux.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les virus sont les organismes les plus efficaces pour le transfert de gènes dans les cellules animales. La mise au point d'un vecteur synthétique capable de remplacer les virus et ayant leur efficacité, implique que toutes les étapes conduisant à la transfection de la cellule soient identifiées pour élaborer un vecteur qui pourra efficacement faire franchir à un gène les différentes barrières intracellulaires et extracellulaires. Un vecteur très efficace pourrait être un complexe multifonctionnel dont chaque élément correspondrait à une étape particulière. Chacun des éléments pourrait être éliminé après avoir joué son rôle. De nombreux vecteurs synthétiques ont montré leur efficacité *in vitro*. Or ils sont peu efficaces *in vivo*.

L'administration systémique d'ADN vectorisé est une voie privilégiée pour la thérapie génique des maladies pulmonaires comme la mucoviscidose ou le cancer. Dans des modèles animaux (souris et rat), l'utilisation de vecteurs synthétiques efficaces comme la polyéthylèneimine a permis de rétablir la fonction de la protéine CFTR ou a eu un effet anti-tumoral. Cependant, la stabilité des complexes dans le sang, l'innocuité immunologique et le ciblage des poumons ne sont pas encore maîtrisés. L'utilisation chez l'homme de tels vecteurs nécessite donc des études sur des cellules humaines en culture. Il est, en effet, nécessaire de construire des vecteurs capables de franchir les différentes barrières extracellulaires rencontrées lors d'une injection systémique. Les études sur des cellules isolées *in vitro* étant trop éloignées de la réalité biologique, des systèmes intégrés simulant les conditions physiologiques doivent être élaborés.

Les travaux que nous avons réalisés avec les complexes ADN/pLK-His et ADN/PEI s'inscrivent dans cette démarche. Nous avons tout d'abord élaboré un modèle d'endothélium microvasculaire pulmonaire grâce auquel nous avons pu déterminer les voies d'internalisation des complexes, leur capacité à traverser la barrière endothéliale pour transférer les cellules sous jacentes et étudier leur adhésion en conditions de flux.

Les résultats obtenus montrent tout d'abord la nécessité de travailler sur des systèmes de culture cellulaire intégrés. En effet, la polarisation des cellules endothéliales modifie les voies d'internalisation des polyplexes pLK-His. Les voies d'internalisation des polyplexes PEI ne sont, par contre, pas modifiées. De plus, pour les deux types de complexes, l'internalisation est plus faible lorsque les cellules sont polarisées. Malgré cela, les polyplexes PEI se sont montrés tout aussi efficaces pour transférer ces cellules. Ces polyplexes sont internalisés par la voie dépendante de la clathrine aussi bien dans les cellules non polarisées que dans les cellules polarisées. Malgré une internalisation de deux à quatre fois moins importante dans les cellules polarisées et l'absence de division cellulaire l'expression du gène n'est pas réduite. Les polyplexes pLK-His sont, eux, très peu efficaces pour transférer les cellules endothéliales polarisées. En effet, la polarisation des cellules abolie la voie dépendante de la clathrine réduisant très fortement l'accumulation des polyplexes pLK-His dans des compartiments acides ce qui est la base sur laquelle repose leur capacité à faire sortir l'ADN des endosomes.

De la même façon, les polyplexes PEI, internalisés par le côté basolatéral, transfectent aussi efficacement des cellules épithéliales Σ CFTE29o- polarisées que les cellules endothéliales. Par contre, les polyplexes pLK-His sont 1000 fois plus efficaces pour transférer les cellules épithéliales que les cellules endothéliales. Dans les cellules épithéliales, leur efficacité est proche de celle de la PEI.

L'ensemble de ces résultats montre qu'il est indispensable d'étudier les vecteurs de transfert de gènes sur un modèle intégré d'endothélium pulmonaire. La pLK-His représente potentiellement un meilleur candidat que la PEI pour un transfert de gènes sélectif dans les cellules épithéliales humaines à conditions que les polyplexes soient capables de traverser la barrière endothéliale de façon intacte.

Nous avons montré que notre modèle d'endothélium microvasculaire cultivé sur filtre était adapté à l'étude du passage transendothélial des polyplexes. Nous avons observé que seulement 10 % des polyplexes traversaient le filtre. L'efficacité de transfection de ces polyplexes filtrés est similaire à celle des polyplexes non filtrés. La filtration à travers la membrane poreuse sélectionne des polyplexes plus petits et plus négatifs qui seraient plus efficaces. Les polyplexes pLK-His et PEI sont capables de traverser la monocouche de cellules endothéliales dans un état intact avec conservation de leur capacité à transférer des cellules épithéliales par exemple. Chez les patients atteints de mucoviscidose ou d'un cancer du poumon, une inflammation de l'endothélium pulmonaire est observée avec une concentration plus élevée en cytokines IL-1 β et TNF- α au niveau de cet endothélium. Nous avons donc examiné l'effet de ces cytokines sur le passage transendothélial des polyplexes pLK-His et PEI. Bien que préliminaires, ces expériences montrent que IL-1 β et TNF- α augmentent ce passage à travers la monocouche de cellules endothéliales sans doute par la voie paracellulaire. Il n'est cependant pas exclu que la transcytose puisse intervenir dans le passage des polyplexes de petites tailles. D'autres études sont nécessaires pour quantifier la part de la voie paracellulaire et de la transcytose dans le passage transendothélial des polyplexes.

Enfin, l'attachement des polyplexes PEI et pLK-His a été étudié par vidéo-microscopie en conditions de flux. La fixation de ces polyplexes sur une monocouche de cellules endothéliales dépend en effet des forces de cisaillement provoquées par le flux du milieu. Pour des vitesses de flux rencontrées dans des microvaisseaux, les polyplexes se lient plus aux cellules qu'à des forces de cisaillement présentes dans les veines. La fixation des polyplexes est diminuée en présence de forte quantité de sérum. Ceci est relié au fait que des protéines sériques s'adsorbent sur les polyplexes cationiques ce qui diminue leur taille, leur charge, leur vitesse de sédimentation et pourraient masquer des sites de fixation à la surface de la monocouche.

Ce type de mesures pourrait être effectué dans un système encore plus intégré en introduisant par exemple des cellules sanguines (globules rouges, leucocytes...) dans le milieu pour se rapprocher de la composition du sang. Notre système pourrait être utilisé avec d'autres lignées de cellules endothéliales disponibles au laboratoire. Il a permis de mettre en évidence des différences de fixation entre des polyplexes munis d'un signal de reconnaissance comme le tétraglycose sur la PEI et des polyplexes non modifiés.

Nous disposons donc aujourd'hui de modèles *in vitro* de la barrière endothéliale pulmonaire puissants pour étudier le comportement des vecteurs synthétiques dans un flux sanguin, leurs capacités à adhérer sur les cellules endothéliales et à traverser cette barrière. Ces modèles permettent de réaliser un criblage rapide et aisé de différents vecteurs. Des recherches sont encore nécessaires pour préciser le mode de passage transendothélial des polyplexes PEI et pLK-His et pour favoriser un ciblage du poumon. Notre modèle de bicouche de cellules endothéliales et épithéliales, en particulier, pourrait être utilisé pour étudier des vecteurs possédant des fonctionnalités leur permettant d'améliorer leur efficacité de transfert de gène *in vivo*. Ces systèmes de vectorisation multiligands pourraient s'inspirer de l'attachement des leucocytes sur les cellules endothéliales et leur passage à travers la barrière vasculaire. Les leucocytes et les cellules endothéliales possèdent en effet des molécules d'adhésion cellulaire (CAM). Les sélectines permettent notamment l'adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales malgré le courant de la circulation sanguine. L'adhésion définitive nécessite la participation d'intégrines. Ainsi, il pourrait être envisagé d'utiliser à la fois un ligand spécifique des cellules endothéliales pulmonaires emprunté au modèle de l'adhésion des leucocytes pour obtenir une meilleure fixation en conditions de flux, un ligand favorisant le passage transendothélial ainsi qu'un ligand spécifique des cellules cibles sous jacentes à la barrière vasculaire.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N. and Aminabhavi T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release*. 100: 5-28.
- Ali J., Liao F., Martens E. and Muller W. A. (1997). Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin): cloning and role in endothelial cell-cell adhesion. *Microcirculation*. 4: 267-277.
- Allen L. A. and Aderem A. (1996). Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med*. 184: 627-637.
- Allo J. C., Midoux P., Merten M., Souil E., Lipecka J., Figarella C., Monsigny M., Briand P., *et al.* (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.
- Anderson W. F. (1998). Human gene therapy. *Nature*. 392: 25-30.
- Aniento F., Emans N., Griffiths G. and Gruenberg J. (1993). Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol*. 123: 1373-1387.
- Antonetti D. A., Wolpert E. B., DeMaio L., Harhaj N. S. and Scaduto R. C., Jr. (2002). Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin. *J Neurochem*. 80: 667-677.
- Aoki Y., Hosaka S., Kawa S. and Kiyosawa K. (2001). Potential tumor-targeting peptide vector of histidylated oligolysine conjugated to a tumor-homing RGD motif. *Cancer Gene Ther*. 8: 783-787.
- Bakhai A., Sheridan D. J. and Coutelle C. C. (2002). "Bronchial artery delivery of viral vectors for gene delivery in cystic fibrosis; superior to airway delivery?" *BMC Pulm Med*. 2: 2.
- Balyasnikova I. V., Metzger R., Visintine D. J., Dimasius V., Sun Z. L., Berestetskaya Y. V., McDonald T. D., Curiel D. T., *et al.* (2005). Selective rat lung endothelial targeting with a new set of monoclonal antibodies to angiotensin I-converting enzyme. *Pulm Pharmacol Ther*. 18: 251-267.
- Bar-Sagi D. and Feramisco J. R. (1986). Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science*. 233: 1061-1068.
- Bass M. D. and Humphries M. J. (2002). Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. *Biochem J*. 368: 1-15.
- Bates D. O., Hillman N. J., Williams B., Neal C. R. and Pockock T. M. (2002). Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat*. 200: 581-597.
- Behr J. P. (1994). Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjug Chem*. 5: 382-389.

- Behr J. P., Demeneix B., Loeffler J. P. and Perez-Mutul J. (1989). Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86: 6982-6986.
- Bello Roufai M. and Midoux P. (2001). Histidylated polylysine as DNA vector: elevation of the imidazole protonation and reduced cellular uptake without change in the polyfection efficiency of serum stabilized negative polyplexes. *Bioconjug Chem*. 12: 92-99.
- Benns J. M., Choi J. S., Mahato R. I., Park J. S. and Kim S. W. (2000). pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. *Bioconjug Chem*. 11: 637-645.
- Bettinger T., Carlisle R. C., Read M. L., Ogris M. and Seymour L. W. (2001). Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells. *Nucleic Acids Res*. 29: 3882-3891.
- Bielinska A., Kukowska-Latallo J. F., Johnson J., Tomalia D. A. and Baker J. R., Jr. (1996). Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res*. 24: 2176-2182.
- Blum M. S., Toninelli E., Anderson J. M., Balda M. S., Zhou J., O'Donnell L., Pardi R. and Bender J. R. (1997). Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am J Physiol*. 273: H286-294.
- Boeckle S., von Gersdorff K., van der Piepen S., Culmsee C., Wagner E. and Ogris M. (2004). Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J Gene Med*. 6: 1102-1111.
- Bolton S. J., Anthony D. C. and Perry V. H. (1998). Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience*. 86: 1245-1257.
- Bonfield T. L., Panuska J. R., Konstan M. W., Hilliard K. A., Hilliard J. B., Ghnaim H. and Berger M. (1995). Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 152: 2111-2118.
- Boucher R. C. (2002). An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 54: 1359-1371.
- Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B. and Behr J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 7297-7301.
- Bragonzi A., Dina G., Villa A., Calori G., Biffi A., Bordignon C., Assael B. M. and Conese M. (2000). Biodistribution and transgene expression with nonviral cationic vector/DNA complexes in the lungs. *Gene Ther*. 7: 1753-1760.
- Breslin J. W., Pappas P. J., Cerveira J. J., Hobson R. W., 2nd and Duran W. N. (2003). VEGF increases endothelial permeability by separate signaling pathways involving ERK-1/2 and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284: H92-H100.

- Butler P. J., Norwich G., Weinbaum S. and Chien S. (2001). Shear stress induces a time- and position-dependent increase in endothelial cell membrane fluidity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280: C962-969.
- Caplan S., Hartnell L. M., Aguilar R. C., Naslavsky N. and Bonifacino J. S. (2001). Human Vam6p promotes lysosome clustering and fusion in vivo. *J Cell Biol.* 154: 109-122.
- Carrabino S., Di Gioia S., Copreni E. and Conese M. (2005). Serum albumin enhances polyethylenimine-mediated gene delivery to human respiratory epithelial cells. *J Gene Med.*
- Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., *et al.* (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 288: 669-672.
- Chen Q. R., Zhang L., Luther P. W. and Mixson A. J. (2002). Optimal transfection with the HK polymer depends on its degree of branching and the pH of endocytic vesicles. *Nucleic Acids Res.* 30: 1338-1345.
- Chen Q. R., Zhang L., Gasper W. and Mixson A. J. (2001). Targeting tumor angiogenesis with gene therapy. *Mol Genet Metab.* 74: 120-127.
- Chen T. R. (1977). In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res.* 104: 255-262.
- Chen X., Sievers E., Hou Y., Park R., Tohme M., Bart R., Bremner R., Bading J. R., *et al.* (2005). Integrin alpha v beta 3-targeted imaging of lung cancer. *Neoplasia.* 7: 271-279.
- Chen Y. A. and Scheller R. H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 98-106.
- Chen Y. L., Jan K. M., Lin H. S. and Chien S. (1997). Relationship between endothelial cell turnover and permeability to horseradish peroxidase. *Atherosclerosis.* 133: 7-14.
- Cheng S. H., Gregory R. J., Marshall J., Paul S., Souza D. W., White G. A., O'Riordan C. R. and Smith A. E. (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell.* 63: 827-834.
- Cho C. H., Lee C. S., Chang M., Jang I. H., Kim S. J., Hwang I., Ryu S. H., Lee C. O., *et al.* (2004). Localization of VEGFR-2 and PLD2 in endothelial caveolae is involved in VEGF-induced phosphorylation of MEK and ERK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286: H1881-1888.
- Chollet P., Favrot M. C., Hurbin A. and Coll J. L. (2002). Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med.* 4: 84-91.
- Chuang P. T., Cheng H. J., Lin S. J., Jan K. M., Lee M. M. and Chien S. (1990). Macromolecular transport across arterial and venous endothelium in rats. Studies with Evans blue-albumin and horseradish peroxidase. *Arteriosclerosis.* 10: 188-197.
- Clamme J. P., Azoulay J. and Mely Y. (2003). Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J.* 84: 1960-1968.

- Comerford K. M., Lawrence D. W., Synnestvedt K., Levi B. P. and Colgan S. P. (2002). Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in PKA-induced changes in endothelial junctional permeability. *Faseb J.* 16: 583-585.
- Conway E. M., Collen D. and Carmeliet P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 49: 507-521.
- Costantini F. and Lacy E. (1981). Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. *Nature.* 294: 92-94.
- Costantini R. M., Falcioni R., Battista P., Zupi G., Kennel S. J., Colasante A., Ventura I., Curio C. G., *et al.* (1990). Integrin (alpha 6/beta 4) expression in human lung cancer as monitored by specific monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 50: 6107-6112.
- Cristiano R. J. and Roth J. A. (1996). Epidermal growth factor mediated DNA delivery into lung cancer cells via the epidermal growth factor receptor. *Cancer Gene Ther.* 3: 4-10.
- Croyle M. A., Cheng X., Sandhu A. and Wilson J. M. (2001). Development of novel formulations that enhance adenoviral-mediated gene expression in the lung in vitro and in vivo. *Mol Ther.* 4: 22-28.
- Damiano E. R. (1998). The effect of the endothelial-cell glycocalyx on the motion of red blood cells through capillaries. *Microvasc Res.* 55: 77-91.
- Danieli T., Pelletier S. L., Henis Y. I. and White J. M. (1996). Membrane fusion mediated by the influenza virus hemagglutinin requires the concerted action of at least three hemagglutinin trimers. *J Cell Biol.* 133: 559-569.
- Dash P. R., Read M. L., Barrett L. B., Wolfert M. A. and Seymour L. W. (1999). Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther.* 6: 643-650.
- Davies P. F., Robotewskyj A. and Griem M. L. (1994). Quantitative studies of endothelial cell adhesion. Directional remodeling of focal adhesion sites in response to flow forces. *J Clin Invest.* 93: 2031-2038.
- De Vita F., Orditura M., Auriemma A., Infusino S. and Catalano G. (1998). Serum concentrations of proinflammatory cytokines in advanced non small cell lung cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res.* 17: 413-417.
- Delepine P., Montier T., Guillaume C., Vaysse L., Le Pape A. and Ferec C. (2002). Visualization of the transgene distribution according to the administration route allows prediction of the transfection efficacy and validation of the results obtained. *Gene Ther.* 9: 736-739.
- Demeneix B. A., Abdel-Taweb H., Benoist C., Seugnet I. and Behr J. P. (1994). Temporal and spatial expression of lipospermine-compacted genes transferred into chick embryos in vivo. *Biotechniques.* 16: 496-501.
- Dempsey C. E. (1990). The actions of melittin on membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1031: 143-161.

- Densmore C. L., Orson F. M., Xu B., Kinsey B. M., Waldrep J. C., Hua P., Bhogal B. and Knight V. (2000). Aerosol delivery of robust polyethyleneimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Mol Ther.* 1: 180-188.
- Derrien D., Midoux P., Petit C., Negre E., Mayer R., Monsigny M. and Roche A. C. (1989). Muramyl dipeptide bound to poly-L-lysine substituted with mannose and gluconoyl residues as macrophage activators. *Glycoconj J.* 6: 241-255.
- Desigaux L., Gourden C., Bello-Roufai M., Richard P., Oudrhiri N., Lehn P., Escande D., Pollard H., *et al.* (2005). Nonionic Amphiphilic Block Copolymers Promote Gene Transfer to the Lung. *Hum Gene Ther.*
- Desjardins C. and Duling B. R. (1990). Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *Am J Physiol.* 258: H647-654.
- Dini L., Pagliara P. and Carla E. C. (2002). Phagocytosis of apoptotic cells by liver: a morphological study. *Microsc Res Tech.* 57: 530-540.
- Dorin J. R., Farley R., Webb S., Smith S. N., Farini E., Delaney S. J., Wainwright B. J., Alton E. W., *et al.* (1996). A demonstration using mouse models that successful gene therapy for cystic fibrosis requires only partial gene correction. *Gene Ther.* 3: 797-801.
- Duchler M., Pengg M., Brunner S., Muller M., Brem G. and Wagner E. (2001). Transfection of epithelial cells is enhanced by combined treatment with mannitol and polyethyleneglycol. *J Gene Med.* 3: 115-124.
- Dudek S. M. and Garcia J. G. (2001). Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol.* 91: 1487-1500.
- Eichman J. D., Bielinska A. U., Kukowska-Latallo J. F. and Baker J. R., Jr. (2000). The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharm. Sci. Technol. Today.* 3: 232-245.
- El-Aneed A. (2004). Current strategies in cancer gene therapy. *Eur J Pharmacol.* 498: 1-8.
- Erbacher P., Bettinger T., Belguise-Valladier P., Zou S., Coll J. L., Behr J. P. and Remy J. S. (1999). Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *J Gene Med.* 1: 210-222.
- Erbacher P., Roche A. C., Monsigny M. and Midoux P. (1997). The reduction of the positive charges of polylysine by partial gluconoylation increases the transfection efficiency of polylysine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta.* 1324: 27-36.
- Erbacher P., Roche A. C., Monsigny M. and Midoux P. (1996). Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Exp Cell Res.* 225: 186-194.
- Fajac I., Thevenot G., Bedouet L., Danel C., Riquet M., Merten M., Figarella C., Dall'Ava-Santucci J., *et al.* (2003). Uptake of plasmid/glycosylated polymer complexes and gene transfer efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J Gene Med.* 5: 38-48.

- 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.
- Feldman L. E., Shin K. C., Natale R. B. and Todd R. F., 3rd (1991). Beta 1 integrin expression on human small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 51: 1065-1070.
- Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., *et al.* (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84: 7413-7417.
- Fernandez P., Carretero J., Medina P. P., Jimenez A. I., Rodriguez-Perales S., Paz M. F., Cigudosa J. C., Esteller M., *et al.* (2004). Distinctive gene expression of human lung adenocarcinomas carrying LKB1 mutations. *Oncogene.* 23: 5084-5091.
- Fischer J. R. and Lahm H. (2004). Validation of molecular and immunological factors with predictive importance in lung cancer. *Lung Cancer.* 45 Suppl 2: S151-161.
- Fischer S., Wiesnet M., Renz D. and Schaper W. (2005). H₂O₂ induces paracellular permeability of porcine brain-derived microvascular endothelial cells by activation of the p44/42 MAP kinase pathway. *Eur J Cell Biol.* 84: 687-697.
- Fisher K. J., Choi H., Burda J., Chen S. J. and Wilson J. M. (1996). Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology.* 217: 11-22.
- Floch V., Delepine P., Guillaume C., Loisel S., Chasse S., Le Bolc'h G., Gobin E., Leroy J. P., *et al.* (2000). Systemic administration of cationic phosphonolipids/DNA complexes and the relationship between formulation and lung transfection efficiency. *Biochim Biophys Acta.* 1464: 95-103.
- Florian J. A., Kosky J. R., Ainslie K., Pang Z., Dull R. O. and Tarbell J. M. (2003). Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res.* 93: e136-142.
- Fominaya J., Gasset M., Garcia R., Roncal F., Albar J. P. and Bernad A. (2000). An optimized amphiphilic cationic peptide as an efficient non-viral gene delivery vector. *J Gene Med.* 2: 455-464.
- Forgacs E., Zochbauer-Muller S., Olah E. and Minna J. D. (2001). Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. *Pathol Oncol Res.* 7: 6-13.
- Frederiksen K. S., Abrahamsen N., Cristiano R. J., Damstrup L. and Poulsen H. S. (2000). Gene delivery by an epidermal growth factor/DNA polyplex to small cell lung cancer cell lines expressing low levels of epidermal growth factor receptor. *Cancer Gene Ther.* 7: 262-268.
- Freulon I., Monsigny M., Midoux P. and Mayer R. (2000). Spacer length dependence on the efficiency of dimeric anionic peptides in gene transfer by glycosylated polylysine/plasmid complexes. *Biosci Rep.* 20: 383-398.
- Fung Y. C. and Liu S. Q. (1993). Elementary mechanics of the endothelium of blood vessels. *J Biomech Eng.* 115: 1-12.

- Gagescu R., Demaurex N., Parton R. G., Hunziker W., Huber L. A. and Gruenberg J. (2000). The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol Biol Cell*. 11: 2775-2791.
- Galley H. F. and Webster N. R. (2004). Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 93: 105-113.
- Gao X. and Huang L. (1991). A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 179: 280-285.
- Garcia-Chaumont C., Seksek O., Grzybowska J., Borowski E. and Bolard J. (2000). Delivery systems for antisense oligonucleotides. *Pharmacol Ther*. 87: 255-277.
- Gardner T. W., Leshner T., Khin S., Vu C., Barber A. J. and Brennan W. A., Jr. (1996). Histamine reduces ZO-1 tight-junction protein expression in cultured retinal microvascular endothelial cells. *Biochem J*. 320 (Pt 3): 717-721.
- Garlanda C. and Dejana E. (1997). Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17: 1193-1202.
- Gautam A., Densmore C. L., Golunski E., Xu B. and Waldrep J. C. (2001). Transgene expression in mouse airway epithelium by aerosol gene therapy with PEI-DNA complexes. *Mol Ther*. 3: 551-556.
- Gebb S. and Stevens T. (2004). On lung endothelial cell heterogeneity. *Microvasc Res*. 68: 1-12.
- Geiger M., Stone A., Mason S. N., Oldham K. T. and Guice K. S. (1997). Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells. *Am J Physiol*. 273: L275-281.
- Ghinea N., Mai T. V., Groyer-Picard M. T. and Milgrom E. (1994). How protein hormones reach their target cells. Receptor-mediated transcytosis of hCG through endothelial cells. *J Cell Biol*. 125: 87-97.
- Ghitescu L., Fixman A., Simionescu M. and Simionescu N. (1986). Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *J Cell Biol*. 102: 1304-1311.
- Gilboa E. and Vieweg J. (2004). Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev*. 199: 251-263.
- Gillies E. R. and Frechet J. M. (2005). Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov Today*. 10: 35-43.
- Gilmore I. R., Fox S. P., Hollins A. J., Sohail M. and Akhtar S. (2004). The design and exogenous delivery of siRNA for post-transcriptional gene silencing. *J Drug Target*. 12: 315-340.
- Godbey W. T., Wu K. K. and Mikos A. G. (1999a). Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release*. 60: 149-160.

- Godbey W. T., Wu K. K. and Mikos A. G. (1999b). Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 5177-5181.
- Goldberg P. L., MacNaughton D. E., Clements R. T., Minnear F. L. and Vincent P. A. (2002). p38 MAPK activation by TGF-beta1 increases MLC phosphorylation and endothelial monolayer permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 282: L146-154.
- Goncalves C., Mennesson E., Fuchs R., Gorvel J. P., Midoux P. and Pichon C. (2004). Macropinocytosis of polyplexes and recycling of plasmid via the clathrin-dependent pathway impair the transfection efficiency of human hepatocarcinoma cells. *Mol Ther*. 10: 373-385.
- Goncalves C., Pichon C., Guerin B. and Midoux P. (2002). Intracellular processing and stability of DNA complexed with histidylated polylysine conjugates. *J Gene Med*. 4: 271-281.
- Gopalan B., Ito I., Branch C. D., Stephens C., Roth J. A. and Ramesh R. (2004). Nanoparticle based systemic gene therapy for lung cancer: molecular mechanisms and strategies to suppress nanoparticle-mediated inflammatory response. *Technol Cancer Res Treat*. 3: 647-657.
- Gordon J. W., Scangos G. A., Plotkin D. J., Barbosa J. A. and Ruddle F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77: 7380-7384.
- Gottschalk S., Sparrow J. T., Hauer J., Mims M. P., Leland F. E., Woo S. L. and Smith L. C. (1996). A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther*. 3: 48-57.
- Goula D., Becker N., Lemkine G. F., Normandie P., Rodrigues J., Mantero S., Levi G. and Demeneix B. A. (2000). Rapid crossing of the pulmonary endothelial barrier by polyethylenimine/DNA complexes. *Gene Ther*. 7: 499-504.
- Goula D., Benoist C., Mantero S., Merlo G., Levi G. and Demeneix B. A. (1998). Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther*. 5: 1291-1295.
- Griffin J. P. (1995). Interstitial pulmonary fibrosis and lung cancer. *Chest*. 108: 1193-1194.
- Griffiths G. and Gruenberg J. (1991). The arguments for pre-existing early and late endosomes. *Trends Cell Biol*. 1: 5-9.
- Griffiths G., Hoflack B., Simons K., Mellman I. and Kornfeld S. (1988). The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell*. 52: 329-341.
- Grignani G. and Maiolo A. (2000). Cytokines and hemostasis. *Haematologica*. 85: 967-972.
- Grosse S., Aron Y., Thevenot G., Francois 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., Aron Y., Honore I., Thevenot G., Danel C., Roche A. C., 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., 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.
- Gruenberg J. and Maxfield F. R. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 7: 552-563.
- Gruenberg J., Griffiths G. and Howell K. E. (1989). Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol.* 108: 1301-1316.
- Guang Liu W. and De Yao K. (2002). Chitosan and its derivatives--a promising non-viral vector for gene transfection. *J Control Release.* 83: 1-11.
- Gunter K. C., Khan A. S. and Noguchi P. D. (1993). The safety of retroviral vectors. *Hum Gene Ther.* 4: 643-645.
- Guo W. and Lee R. L. (1999). Receptor-targeted gene delivery via folate-conjugated polyethylenimine. *AAPS PharmSci.* 1: E19.
- Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., McCormack M. P., Wulffraat N., Leboulch P., Lim A., Osborne C. S., *et al.* (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* 302: 415-419.
- Hackett P. B., Ekker S. C., Largaespada D. A. and McIvor R. S. (2005). Sleeping beauty transposon-mediated gene therapy for prolonged expression. *Adv Genet.* 54: 189-232.
- Haensler J. and Szoka F. C., Jr. (1993). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem.* 4: 372-379.
- Halbert C. L. and Miller A. D. (2004). AAV-mediated gene transfer to mouse lungs. *Methods Mol Biol.* 246: 201-212.
- Halbert C. L., Allen J. M. and Miller A. D. (2001). Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. *J Virol.* 75: 6615-6624.
- Harhaj N. S. and Antonetti D. A. (2004). Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 1206-1237.
- Harrington L. E., Most Rv R., Whitton J. L. and Ahmed R. (2002). Recombinant vaccinia virus-induced T-cell immunity: quantitation of the response to the virus vector and the foreign epitope. *J Virol.* 76: 3329-3337.
- Harris S. S. and Giorgio T. D. (2005). Convective flow increases lipoplex delivery rate to in vitro cellular monolayers. *Gene Ther.* 12: 512-520.
- He P., Zeng M. and Curry F. E. (2000). Dominant role of cAMP in regulation of microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278: H1124-1133.

- Heister T., Heid I., Ackermann M. and Fraefel C. (2002). Herpes simplex virus type 1/adeno-associated virus hybrid vectors mediate site-specific integration at the adeno-associated virus preintegration site, AAVS1, on human chromosome 19. *J Virol.* 76: 7163-7173.
- Helmke B. P., Thakker D. B., Goldman R. D. and Davies P. F. (2001). Spatiotemporal analysis of flow-induced intermediate filament displacement in living endothelial cells. *Biophys J.* 80: 184-194.
- Henry C. B. and Duling B. R. (2000). TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279: H2815-2823.
- Henry C. B. and Duling B. R. (1999). Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol.* 277: H508-514.
- Hewlett L. J., Prescott A. R. and Watts C. (1994). The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J Cell Biol.* 124: 689-703.
- Hirsch F. R., Scagliotti G. V., Langer C. J., Varella-Garcia M. and Franklin W. A. (2003). Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer.* 41 Suppl 1: S29-42.
- Hoffman P. C., Mauer A. M. and Vokes E. E. (2000). Lung cancer. *Lancet.* 355: 479-485.
- Hopkins C. R., Gibson A., Shipman M. and Miller K. (1990). Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature.* 346: 335-339.
- Huang F., Subbaiah P. V., Holian O., Zhang J., Johnson A., Gertzberg N. and Lum H. (2005). Lysophosphatidylcholine increases endothelial permeability: role of PKCalpha and RhoA cross talk. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289: L176-185.
- Illi B., Nanni S., Scopece A., Farsetti A., Biglioli P., Capogrossi M. C. and Gaetano C. (2003). Shear stress-mediated chromatin remodeling provides molecular basis for flow-dependent regulation of gene expression. *Circ Res.* 93: 155-161.
- Imyanitov E. N., Kuligina E. S., Belogubova E. V., Togo A. V., Hanson K. P. (2005). Mechanisms of lung cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.* 2: 213-223.
- Ishii T., Okahata Y. and Sato T. (2001). Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim Biophys Acta.* 1514: 51-64.
- Jiang W. G., Bryce R. P., Horrobin D. F. and Mansel R. E. (1998). Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 244: 414-420.
- Jin E., Fujiwara M., Nagashima M., Shimizu H., Ghazizadeh M., Pan X., Arai S., Ohaki Y., *et al.* (2001). Aerogenous spread of primary lung adenocarcinoma induces ultrastructural remodeling of the alveolar capillary endothelium. *Hum Pathol.* 32: 1050-1058.
- Johnson L. G. (1995). Gene therapy for cystic fibrosis. *Chest.* 107: 77S-83S.

- Johnson L. G., Olsen J. C., Sarkadi B., Moore K. L., Swanstrom R. and Boucher R. C. (1992). Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat Genet.* 2: 21-25.
- Kawanami O., Matsuda K., Yoneyama H., Ferrans V. J. and Crystal R. G. (1992). Endothelial fenestration of the alveolar capillaries in interstitial fibrotic lung diseases. *Acta Pathol Jpn.* 42: 177-184.
- Kawano T., Okuda T., Aoyagi H. and Niidome T. (2004). Long circulation of intravenously administered plasmid DNA delivered with dendritic poly(L-lysine) in the blood flow. *J Control Release.* 99: 329-337.
- Kaye F. J. (2001). Molecular biology of lung cancer. *Lung Cancer.* 34 Suppl 2: S35-41.
- Kelly J. J., Moore T. M., Babal P., Diwan A. H., Stevens T. and Thompson W. J. (1998). Pulmonary microvascular and macrovascular endothelial cells: differential regulation of Ca²⁺ and permeability. *Am J Physiol.* 274: L810-819.
- Kevil C. G., Oshima T., Alexander B., Coe L. L. and Alexander J. S. (2000). H₂O₂-mediated permeability: role of MAPK and occludin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279: C21-30.
- Kichler A., Leborgne C., Marz J., Danos O. and Bechinger B. (2003). Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 1564-1568.
- Kichler A., Leborgne C., Coeytaux E. and Danos O. (2001). Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med.* 3: 135-144.
- Kichler A., Freulon I., Boutin V., Mayer R., Monsigny M. and Midoux P. (1999). Glycofection in the presence of anionic fusogenic peptides: a study of the parameters affecting the peptide-mediated enhancement of the transfection efficiency. *J Gene Med.* 1: 134-143.
- Kieda C., Paprocka M., Krawczenko A., Zalecki P., Dupuis P., Monsigny M., Radzikowski C. and Dus D. (2002). New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes. *Endothelium.* 9: 247-261.
- Kim E. M., Jeong H. J., Park I. K., Cho C. S., Bom H. S. and Kim C. G. (2004). Monitoring the effect of PEGylation on polyethylenimine in vivo using nuclear imaging technique. *Nucl Med Biol.* 31: 781-784.
- King J., Hamil T., Creighton J., Wu S., Bhat P., McDonald F. and Stevens T. (2004). Structural and functional characteristics of lung macro- and microvascular endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res.* 67: 139-151.
- Kircheis R., Ostermann E., Wolschek M. F., Lichtenberger C., Magin-Lachmann C., Wightman L., Kursa M. and Wagner E. (2002). Tumor-targeted gene delivery of tumor necrosis factor-alpha induces tumor necrosis and tumor regression without systemic toxicity. *Cancer Gene Ther.* 9: 673-680.

- Kircheis R., Wightman L., Schreiber A., Robitza B., Rossler V., Kursa M. and Wagner E. (2001a). Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther.* 8: 28-40.
- Kircheis R., Blessing T., Brunner S., Wightman L. and Wagner E. (2001b). 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.
- Klink D., Yu Q. C., Glick M. C. and Scanlin T. (2003). Lactosylated poly-L-lysine targets a potential lactose receptor in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *Mol Ther.* 7: 73-80.
- Ko Y. G., Lee J. S., Kang Y. S., Ahn J. H. and Seo J. S. (1999). TNF-alpha-mediated apoptosis is initiated in caveolae-like domains. *J Immunol.* 162: 7217-7223.
- Kohn D. B., Hershfield M. S., Carbonaro D., Shigeoka A., Brooks J., Smogorzewska E. M., Barsky L. W., Chan R., *et al.* (1998). T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med.* 4: 775-780.
- Kollen W. J., Midoux P., Erbacher P., Yip A., Roche A. C., Monsigny M., Glick M. C. and Scanlin T. F. (1996). Gluconoylated and glycosylated polylysines as vectors for gene transfer into cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther.* 7: 1577-1586.
- Konda S. D., Aref M., Wang S., Brechbiel M. and Wiener E. C. (2001). Specific targeting of folate-dendrimer MRI contrast agents to the high affinity folate receptor expressed in ovarian tumor xenografts. *Magma.* 12: 104-113.
- Kong F. M., Anscher M. S., Washington M. K., Killian J. K. and Jirtle R. L. (2000). M6P/IGF2R is mutated in squamous cell carcinoma of the lung. *Oncogene.* 19: 1572-1578.
- Kopatz I., Remy J. S. and Behr J. P. (2004). A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J Gene Med.* 6: 769-776.
- Koping-Hoggard M., Tubulekas I., Guan H., Edwards K., Nilsson M., Varum K. M. and Artursson P. (2001). Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther.* 8: 1108-1121.
- Kotin R. M. (1994). Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum Gene Ther.* 5: 793-801.
- Kukowska-Latallo J. F., Raczka E., Quintana A., Chen C., Rymaszewski M. and Baker J. R., Jr. (2000). Intravascular and endobronchial DNA delivery to murine lung tissue using a novel, nonviral vector. *Hum Gene Ther.* 11: 1385-1395.
- Kunath K., Merdan T., Hegener O., Haberlein H. and Kissel T. (2003). Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer. *J Gene Med.* 5: 588-599.

- Kurzchalia T. V. and Parton R. G. (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol.* 11: 424-431.
- Lamaze C. and Schmid S. L. (1995). The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 7: 573-580.
- Leib D. A. and Olivo P. D. (1993). Gene delivery to neurons: is herpes simplex virus the right tool for the job? *Bioessays.* 15: 547-554.
- Li S., Butler P., Wang Y., Hu Y., Han D. C., Usami S., Guan J. L. and Chien S. (2002). The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 3546-3551.
- Li S., Tan Y., Viroonchatapan E., Pitt B. R. and Huang L. (2000). Targeted gene delivery to pulmonary endothelium by anti-PECAM antibody. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 278: L504-511.
- Li Y. S., Haga J. H. and Chien S. (2005). Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech.* 38: 1949-1971.
- Liu L., Sanz S., Heggstad A. D., Antharam V., Notterpek L. and Fletcher B. S. (2004). Endothelial targeting of the Sleeping Beauty transposon within lung. *Mol Ther.* 10: 97-105.
- Lopez-Ongil S., Torrecillas G., Perez-Sala D., Gonzalez-Santiago L., Rodriguez-Puyol M. and Rodriguez-Puyol D. (1999). Mechanisms involved in the contraction of endothelial cells by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 26: 501-510.
- Lum H. and Malik A. B. (1996). Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol.* 74: 787-800.
- Ma P. C., Jagadeeswaran R., Jagadeesh S., Tretiakova M. S., Nallasura V., Fox E. A., Hansen M., Schaefer E., *et al.* (2005). Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 65: 1479-1488.
- Magno M. (1990). Comparative anatomy of the tracheobronchial circulation. *Eur Respir J Suppl.* 12: 557s-562s; discussion 562s-563s.
- Mahato R. I. (1999). Non-viral peptide-based approaches to gene delivery. *J Drug Target.* 7: 249-268.
- Mannermaa E., Ronkko S., Ruponen M., Reinisalo M. and Urtti A. (2005). Long-lasting secretion of transgene product from differentiated and filter-grown retinal pigment epithelial cells after nonviral gene transfer. *Curr Eye Res.* 30: 345-353.
- Mao H. Q., Roy K., Troung-Le V. L., Janes K. A., Lin K. Y., Wang Y., August J. T. and Leong K. W. (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release.* 70: 399-421.
- Matanic D., Beg-Zec Z., Stojanovic D., Matakoric N., Flego V. and Milevoj-Ribic F. (2003). Cytokines in patients with lung cancer. *Scand J Immunol.* 57: 173-178.

- Matter K. and Balda M. S. (2003). Functional analysis of tight junctions. *Methods*. 30: 228-234.
- McIntosh D. P., Tan X. Y., Oh P. and Schnitzer J. E. (2002). Targeting endothelium and its dynamic caveolae for tissue-specific transcytosis in vivo: a pathway to overcome cell barriers to drug and gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 1996-2001.
- McKenzie D. L., Smiley E., Kwok K. Y. and Rice K. G. (2000a). Low molecular weight disulfide cross-linking peptides as nonviral gene delivery carriers. *Bioconjug Chem*. 11: 901-909.
- McKenzie D. L., Kwok K. Y. and Rice K. G. (2000b). A potent new class of reductively activated peptide gene delivery agents. *J Biol Chem*. 275: 9970-9977.
- McKenzie D. L., Collard W. T. and Rice K. G. (1999). Comparative gene transfer efficiency of low molecular weight polylysine DNA-condensing peptides. *J Pept Res*. 54: 311-318.
- McMullen M. E., Bryant P. W., Glembotski C. C., Vincent P. A. and Pumiglia K. M. (2005). Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of endothelial cells. *J Biol Chem*. 280: 20995-21003.
- Medina M. F., Kobinger G. P., Rux J., Gasmi M., Looney D. J., Bates P. and Wilson J. M. (2003). Lentiviral vectors pseudotyped with minimal filovirus envelopes increased gene transfer in murine lung. *Mol Ther*. 8: 777-789.
- Miao H., Hu Y. L., Shiu Y. T., Yuan S., Zhao Y., Kaunas R., Wang Y., Jin G., *et al.* (2005). Effects of flow patterns on the localization and expression of VE-cadherin at vascular endothelial cell junctions: in vivo and in vitro investigations. *J Vasc Res*. 42: 77-89.
- Michel C. C. and Curry F. E. (1999). Microvascular permeability. *Physiol Rev*. 79: 703-761.
- Midoux P. & Pichon C. (2002). Peptide-based gene delivery systems. *Pharmaceutical Perspectives of nucleic acid-based therapeutics*, 334-366.
- Midoux P. and Monsigny M. (1999). Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug Chem*. 10: 406-411.
- Midoux P., Kichler A., Boutin V., Maurizot J. C. and Monsigny M. (1998). Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconjug Chem*. 9: 260-267.
- Midoux P., Mayer R. and Monsigny M. (1995). Membrane permeabilization by alpha-helical peptides: a flow cytometry study. *Biochim Biophys Acta*. 1239: 249-256.
- Midoux P., Mendes C., Legrand A., Raimond J., Mayer R., Monsigny M. and Roche A. C. (1993). Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res*. 21: 871-878.
- Miller D. G., Adam M. A. and Miller A. D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol*. 10: 4239-4242.

- Miller F., Fenart L., Landry V., Coisne C., Cecchelli R., Dehouck M. P. and Buee-Scherrer V. (2005). The MAP kinase pathway mediates transcytosis induced by TNF-alpha in an in vitro blood-brain barrier model. *Eur J Neurosci.* 22: 835-844.
- Mineo C. and Anderson R. G. (1996). A vacuolar-type proton ATPase mediates acidification of plasmalemmal vesicles during potocytosis. *Exp Cell Res.* 224: 237-242.
- Mislick K. A. and Baldeschwieler J. D. (1996). Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 12349-12354.
- Mitani K. and Kubo S. (2002). Adenovirus as an integrating vector. *Curr Gene Ther.* 2: 135-144.
- Montier T., Delepine P., Pichon C., Ferec C., Porteous D. J. and Midoux P. (2004a). Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trends Biotechnol.* 22: 586-592.
- Montier T., Delepine P., Le Ny K., Fichou Y., Le Bris M., Hardy E., Picquet E., Clement J. C., *et al.* (2004b). KLN-5: a safe monocationic lipophosphoramidate to transfect efficiently haematopoietic cell lines and human CD34+ cells. *Biochim Biophys Acta.* 1665: 118-133.
- Moore T. M., Chetham P. M., Kelly J. J. and Stevens T. (1998). Signal transduction and regulation of lung endothelial cell permeability. Interaction between calcium and cAMP. *Am J Physiol.* 275: L203-222.
- Morre D. J., Widnell C. J. and Thilo L. (1984). Membrane dynamics: flow routes and quantitation of membrane transport and recycling. *Fed Proc.* 43: 2884-2887.
- Mountain A. (2000). Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol.* 18: 119-128.
- Mousavi S. A., Malerod L., Berg T. and Kjekken R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J.* 377: 1-16.
- Mullen P. M., Lollo C. P., Phan Q. C., Amini A., Banaszczyk M. G., Fabrycki J. M., Wu D., Carlo A. T., *et al.* (2000). Strength of conjugate binding to plasmid DNA affects degradation rate and expression level in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1523: 103-110.
- Mullock B. M., Bright N. A., Fearon C. W., Gray S. R. and Luzio J. P. (1998). Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol.* 140: 591-601.
- Mumper R.J., Wang J., Claspell J.M., Rolland A.P. (1995). Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 22: 178-179.
- Murata M., Sugahara Y., Takahashi S. and Ohnishi S. (1987). pH-dependent membrane fusion activity of a synthetic twenty amino acid peptide with the same sequence as that of the hydrophobic segment of influenza virus hemagglutinin. *J Biochem (Tokyo).* 102: 957-962.
- Murphy R. F. (1991). Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol.* 1: 77-82.

- Nichols B. J. and Lippincott-Schwartz J. (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* 11: 406-412.
- Nicolau C. and Cudd A. (1989). Liposomes as carriers of DNA. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 6: 239-271.
- Niidome T., Takaji K., Urakawa M., Ohmori N., Wada A., Hirayama T. and Aoyagi H. (1999). Chain length of cationic alpha-helical peptide sufficient for gene delivery into cells. *Bioconjug Chem.* 10: 773-780.
- Nishioka M., Kohno T., Tani M., Yanaihara N., Tomizawa Y., Otsuka A., Sasaki S., Kobayashi K., *et al.* (2002). MYO18B, a candidate tumor suppressor gene at chromosome 22q12.1, deleted, mutated, and methylated in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 12269-12274.
- Niwa K., Inanami O., Ohta T., Ito S., Karino T. and Kuwabara M. (2001). p38 MAPK and Ca²⁺ contribute to hydrogen peroxide-induced increase of permeability in vascular endothelial cells but ERK does not. *Free Radic Res.* 35: 519-527.
- Norman J., Denham W., Denham D., Yang J., Carter G., Abouhamze A., Tannahill C. L., MacKay S. L., *et al.* (2000). Liposome-mediated, nonviral gene transfer induces a systemic inflammatory response which can exacerbate pre-existing inflammation. *Gene Ther.* 7: 1425-1430.
- Nwariaku F. E., Rothenbach P., Liu Z., Zhu X., Turnage R. H. and Terada L. S. (2003). Rho inhibition decreases TNF-induced endothelial MAPK activation and monolayer permeability. *J Appl Physiol.* 95: 1889-1895.
- Nwariaku F. E., Chang J., Zhu X., Liu Z., Duffy S. L., Halaihel N. H., Terada L. and Turnage R. H. (2002). The role of p38 map kinase in tumor necrosis factor-induced redistribution of vascular endothelial cadherin and increased endothelial permeability. *Shock.* 18: 82-85.
- Ogris M., Steinlein P., Carotta S., Brunner S. and Wagner E. (2001a). DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS PharmSci.* 3: E21.
- Ogris M., Carlisle R. C., Bettinger T. and Seymour L. W. (2001b). Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors. *J Biol Chem.* 276: 47550-47555.
- Ogris M., Brunner S., Schuller 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.
- Oh P., McIntosh D. P. and Schnitzer J. E. (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol.* 141: 101-114.
- Ohura N., Yamamoto K., Ichioka S., Sokabe T., Nakatsuka H., Baba A., Shibata M., Nakatsuka T., *et al.* (2003). Global analysis of shear stress-responsive genes in vascular endothelial cells. *J Atheroscler Thromb.* 10: 304-313.

- Okamoto H., Nishida S., Todo H., Sakakura Y., Iida K. and Danjo K. (2003). Pulmonary gene delivery by chitosan-pDNA complex powder prepared by a supercritical carbon dioxide process. *J Pharm Sci.* 92: 371-380.
- Opanasopit P., Nishikawa M. and Hashida M. (2002). Factors affecting drug and gene delivery: effects of interaction with blood components. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 19: 191-233.
- Orson F. M., Kinsey B. M., Hua P. J., Bhogal B. S., Densmore C. L. and Barry M. A. (2000). Genetic immunization with lung-targeting macroaggregated polyethyleneimine-albumin conjugates elicits combined systemic and mucosal immune responses. *J Immunol.* 164: 6313-6321.
- Oupicky D., Ogris M., Howard K. A., Dash P. R., Ulbrich K. and Seymour L. W. (2002). Importance of lateral and steric stabilization of polyelectrolyte gene delivery vectors for extended systemic circulation. *Mol Ther.* 5: 463-472.
- Palsson B. and Andreadis S. (1997). The physico-chemical factors that govern retrovirus-mediated gene transfer. *Exp Hematol.* 25: 94-102.
- Parker J. C. and Yoshikawa S. (2002). Vascular segmental permeabilities at high peak inflation pressure in isolated rat lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283: L1203-1209.
- Parton R. G., Prydz K., Bomsel M., Simons K. and Griffiths G. (1989). Meeting of the apical and basolateral endocytic pathways of the Madin-Darby canine kidney cell in late endosomes. *J Cell Biol.* 109: 3259-3272.
- Patel M., Vivien E., Hauchecorne M., Oudrhiri N., Ramasawmy R., Vigneron J. P., Lehn P. and Lehn J. M. (2001). Efficient gene transfection by bisguanylated diacetylene lipid formulations. *Biochem Biophys Res Commun.* 281: 536-543.
- Pelkmans L., Kartenbeck J. and Helenius A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol.* 3: 473-483.
- Perales J. C., Grossmann G. A., Molas M., Liu G., Ferkol T., Harpst J., Oda H. and Hanson R. W. (1997). Biochemical and functional characterization of DNA complexes capable of targeting genes to hepatocytes via the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem.* 272: 7398-7407.
- Perrie Y. and Gregoriadis G. (2000). Liposome-entrapped plasmid DNA: characterisation studies. *Biochim Biophys Acta.* 1475: 125-132.
- Petersen H., Fechner P. M., Martin A. L., Kunath K., Stolnik S., Roberts C. J., Fischer D., Davies M. C., *et al.* (2002). Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjug Chem.* 13: 845-854.
- Pichon C., Goncalves C. and Midoux P. (2001). Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 53: 75-94.

- Pichon C., Roufai M. B., Monsigny M. and Midoux P. (2000). Histidylated oligolysines increase the transmembrane passage and the biological activity of antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 28: 504-512.
- Pitard B., Oudrhiri N., Vigneron J. P., Hauchecorne M., Aguerre O., Toury R., Airiau M., Ramasawmy R., *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.
- Plank C., Tang M. X., Wolfe A. R. and Szoka F. C., Jr. (1999). Branched cationic peptides for gene delivery: role of type and number of cationic residues in formation and in vitro activity of DNA polyplexes. *Hum Gene Ther.* 10: 319-332.
- Plank C., Mechtler K., Szoka F. C., Jr. and Wagner E. (1996). Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther.* 7: 1437-1446.
- Plank C., Oberhauser B., Mechtler K., Koch C. and Wagner E. (1994). The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem.* 269: 12918-12924.
- Pollard H., Remy J. S., Loussouarn G., Demolombe S., Behr J. P. and Escande D. (1998). Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem.* 273: 7507-7511.
- Predescu D. and Palade G. E. (1993). Plasmalemmal vesicles represent the large pore system of continuous microvascular endothelium. *Am J Physiol.* 265: H725-733.
- Predescu S. A., Predescu D. N. and Palade G. E. (2001). Endothelial transcytotic machinery involves supramolecular protein-lipid complexes. *Mol Biol Cell.* 12: 1019-1033.
- Putnam D., Gentry C. A., Pack D. W. and Langer R. (2001). Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 1200-1205.
- Qiao J., Doubrovin M., Sauter B. V., Huang Y., Guo Z. S., Balatoni J., Akhurst T., Blasberg R. G., *et al.* (2002). Tumor-specific transcriptional targeting of suicide gene therapy. *Gene Ther.* 9: 168-175.
- Qiao R. L. and Bhattacharya J. (1991). Segmental barrier properties of the pulmonary microvascular bed. *J Appl Physiol.* 71: 2152-2159.
- Quenneville S. P., Chapdelaine P., Rousseau J., Beaulieu J., Caron N. J., Skuk D., Mills P., Olivares E. C., *et al.* (2004). Nucleofection of muscle-derived stem cells and myoblasts with phiC31 integrase: stable expression of a full-length-dystrophin fusion gene by human myoblasts. *Mol Ther.* 10: 679-687.
- Racoosin E. L. and Swanson J. A. (1993). Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J Cell Biol.* 121: 1011-1020.

- Radel C. and Rizzo V. (2005). Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288: H936-945.
- Read M. L., Singh S., Ahmed Z., Stevenson M., Briggs S. S., Oupicky D., Barrett L. B., Spice R., *et al.* (2005). A versatile reducible polycation-based system for efficient delivery of a broad range of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 33: e86.
- Reynolds P. N., Zinn K. R., Gavriilyuk V. D., Balyasnikova I. V., Rogers B. E., Buchsbaum D. J., Wang M. H., Miletich D. J., *et al.* (2000). A targetable, injectable adenoviral vector for selective gene delivery to pulmonary endothelium in vivo. *Mol Ther.* 2: 562-578.
- Ribas A., Butterfield L. H., Glaspy J. A. and Economou J. S. (2002). Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells. *Curr Gene Ther.* 2: 57-78.
- Ribatti D., Nico B., Vacca A., Roncali L. and Dammacco F. (2002). Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. *J Hematother Stem Cell Res.* 11: 81-90.
- Riordan J. R., Rommens J. M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., *et al.* (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 245: 1066-1073.
- Rittner K., Benavente A., Bompard-Sorlet A., Heitz F., Divita G., Brasseur R. and Jacobs E. (2002). New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther.* 5: 104-114.
- Rizzo V., Morton C., DePaola N., Schnitzer J. E. and Davies P. F. (2003). Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285: H1720-1729.
- Roberts W. G. and Palade G. E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci.* 108 (Pt 6): 2369-2379.
- Romano M., Collura M., Lapichino L., Pardo F., Falco A., Chiesa P. L., Caimi G. and Davi G. (2001). Endothelial perturbation in cystic fibrosis. *Thromb Haemost.* 86: 1363-1367.
- Rosenberg S. A., Aebersold P., Cornetta K., Kasid A., Morgan R. A., Moen R., Karson E. M., Lotze M. T., *et al.* (1990). Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med.* 323: 570-578.
- Rudolph C., Schillinger U., Plank C., Gessner A., Nicklaus P., Muller R. and Rosenecker J. (2002). Nonviral gene delivery to the lung with copolymer-protected and transferrin-modified polyethylenimine. *Biochim Biophys Acta.* 1573: 75-83.
- Sagripanti A. and Carpi A. (2000). Antithrombotic and prothrombotic activities of the vascular endothelium. *Biomed Pharmacother.* 54: 107-111.
- Sandoval R., Malik A. B., Minshall R. D., Kouklis P., Ellis C. A. and Tiruppathi C. (2001). Ca(2+) signalling and PKCalpha activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions. *J Physiol.* 533: 433-445.

- Sato M., Nagayama K., Kataoka N., Sasaki M. and Hane K. (2000). Local mechanical properties measured by atomic force microscopy for cultured bovine endothelial cells exposed to shear stress. *J Biomech.* 33: 127-135.
- Sato Y. (2001). Current understanding of the biology of vascular endothelium. *Cell Struct Funct.* 26: 9-10.
- Schatzlein A. G., Zinselmeyer B. H., Elouzi A., Dufes C., Chim Y. T., Roberts C. J., Davies M. C., Munro A., *et al.* (2005). Preferential liver gene expression with polypropylenimine dendrimers. *J Control Release.* 101: 247-258.
- Scheule R. K., St George J. A., Bagley R. G., Marshall J., Kaplan J. M., Akita G. Y., Wang K. X., Lee E. R., *et al.* (1997). Basis of pulmonary toxicity associated with cationic lipid-mediated gene transfer to the mammalian lung. *Hum Gene Ther.* 8: 689-707.
- Schnitzer J. E., Liu J. and Oh P. (1995). Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J Biol Chem.* 270: 14399-14404.
- Schnitzer J. E., Oh P., Pinney E. and Allard J. (1994). Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol.* 127: 1217-1232.
- Schwartz B., Ivanov M. A., Pitard B., Escriou V., Rangara R., Byk G., Wils P., Crouzet J., *et al.* (1999). Synthetic DNA-compacting peptides derived from human sequence enhance cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 6: 282-292.
- Scott E. S., Wiseman J. W., Evans M. J. and Colledge W. H. (2001). Enhanced gene delivery to human airway epithelial cells using an integrin-targeting lipoplex. *J Gene Med.* 3: 125-134.
- Sedlacek H. H. (2001). Pharmacological aspects of targeting cancer gene therapy to endothelial cells. *Crit Rev Oncol Hematol.* 37: 169-215.
- Shigematsu H., Lin L., Takahashi T., Nomura M., Suzuki M., Wistuba, II, Fong K. M., Lee H., *et al.* (2005). Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 97: 339-346.
- Siflinger-Birnboim A. and Johnson A. (2003). Protein kinase C modulates pulmonary endothelial permeability: a paradigm for acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284: L435-451.
- Siflinger-Birnboim A., Lum H., Del Vecchio P. J. and Malik A. B. (1996). Involvement of Ca²⁺ in the H₂O₂-induced increase in endothelial permeability. *Am J Physiol.* 270: L973-978.
- Simionescu M., Gafencu A. and Antohe F. (2002). Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey. *Microsc Res Tech.* 57: 269-288.
- Simionescu N. (1983). Cellular aspects of transcapillary exchange. *Physiol Rev.* 63: 1536-1579.

- Squire J. M., Chew M., Nneji G., Neal C., Barry J. and Michel C. (2001). Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: a possible explanation for molecular filtering? *J Struct Biol.* 136: 239-255.
- Staedel C., Remy J. S., Hua Z., Broker T. R., Chow L. T. and Behr J. P. (1994). High-efficiency transfection of primary human keratinocytes with positively charged lipopolyamine:DNA complexes. *J Invest Dermatol.* 102: 768-772.
- Stan R. V., Kubitzka M. and Palade G. E. (1999). PV-1 is a component of the fenestral and stomatal diaphragms in fenestrated endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 13203-13207.
- Stein M. P., Dong J. and Wandinger-Ness A. (2003). Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev.* 55: 1421-1437.
- Stelwagen K., McFadden H. A. and Demmer J. (1999). Prolactin, alone or in combination with glucocorticoids, enhances tight junction formation and expression of the tight junction protein occludin in mammary cells. *Mol Cell Endocrinol.* 156: 55-61.
- Stephens P., Hunter C., Bignell G., Edkins S., Davies H., Teague J., Stevens C., O'Meara S., *et al.* (2004). Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature.* 431: 525-526.
- Swanson J. A. and Watts C. (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5: 424-428.
- Swanson J. A. and Baer S. C. (1995). Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* 5: 89-93.
- Swanson J. A. (1989). Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *J Cell Sci.* 94 (Pt 1): 135-142.
- Swidzinska E., Ossolinska M., Naumnik W., Izycki T., Kucejko W. and Chyczewska E. (2004). [Circulating VEGF and its soluble receptor sVEGFR-1 in patients with lung cancer]. *Pneumonol Alergol Pol.* 72: 389-394.
- Tandia B. M., Vandenbranden M., Wattiez R., Lakhdar Z., Ruyschaert J. M. and Elouahabi A. (2003). Identification of human plasma proteins that bind to cationic lipid/DNA complex and analysis of their effects on transfection efficiency: implications for intravenous gene transfer. *Mol Ther.* 8: 264-273.
- Tang M. X. and Szoka F. C. (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.
- Tang M. X., Redemann C. T. and Szoka F. C., Jr. (1996). In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug Chem.* 7: 703-714.
- Templeton N.S. & Lasic D.D. (2000). Bioorganic colloids, macromolecules, DNA, self-assembled particles and their complexes. *Gene Ther.*, 241-266.
- Thi M. M., Tarbell J. M., Weinbaum S. and Spray D. C. (2004). The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a "bumper-car" model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 16483-16488.

- Thierry A. R., Rabinovich P., Peng B., Mahan L. C., Bryant J. L. and Gallo R. C. (1997). Characterization of liposome-mediated gene delivery: expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA. *Gene Ther.* 4: 226-237.
- Thierry A. R., Lunardi-Iskandar Y., Bryant J. L., Rabinovich P., Gallo R. C. and Mahan L. C. (1995). Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 9742-9746.
- Thurston G. B. (1994). Non-Newtonian viscosity of human blood: flow-induced changes in microstructure. *Biorheology.* 31: 179-192.
- Tiruppathi C., Minshall R. D., Paria B. C., Vogel S. M. and Malik A. B. (2002). Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol.* 39: 173-185.
- Tomalia D. A., Brothers H. M., 2nd, Piehler L. T., Durst H. D. and Swanson D. R. (2002). Partial shell-filled core-shell tecto(dendrimers): a strategy to surface differentiated nano-clefts and cusps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 5081-5087.
- Trepel M., Grifman M., Weitzman M. D. and Pasqualini R. (2000). Molecular adaptors for vascular-targeted adenoviral gene delivery. *Hum Gene Ther.* 11: 1971-1981.
- Tuma P. L. and Hubbard A. L. (2003). Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev.* 83: 871-932.
- Uduehi A. N., Stammberger U., Kubisa B., Gugger M., Buehler T. A. and Schmid R. A. (2001). Effects of linear polyethylenimine and polyethylenimine/DNA on lung function after airway instillation to rat lungs. *Mol Ther.* 4: 52-57.
- Ukropec J. A., Hollinger M. K. and Woolkalis M. J. (2002). Regulation of VE-cadherin linkage to the cytoskeleton in endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Exp Cell Res.* 273: 240-247.
- Verbaan F., van Dam I., Takakura Y., Hashida M., Hennink W., Storm G. and Oussoren C. (2003). Intravenous fate of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-based polyplexes. *Eur J Pharm Sci.* 20: 419-427.
- Vigneron J. P., Oudrhiri N., Fauquet M., Vergely L., Bradley J. C., Basseville M., Lehn P. and Lehn J. M. (1996). Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 9682-9686.
- Vinogradov S. V., Bronich T. K. and Kabanov A. V. (2002). Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 54: 135-147.
- Vogel S. M., Minshall R. D., Pilipovic M., Tiruppathi C. and Malik A. B. (2001). Albumin uptake and transcytosis in endothelial cells in vivo induced by albumin-binding protein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281: L1512-1522.
- Vorbrodt A. W. and Dobrogowska D. H. (2003). Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res Brain Res Rev.* 42: 221-242.

- Wadhwa M. S., Collard W. T., Adami R. C., McKenzie D. L. and Rice K. G. (1997). Peptide-mediated gene delivery: influence of peptide structure on gene expression. *Bioconjug Chem.* 8: 81-88.
- Wagner E. (1999). Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 38: 279-289.
- Wagner E., Plank C., Zatloukal K., Cotten M. and Birnstiel M. L. (1992). Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 7934-7938.
- Wang C. Y. and Huang L. (1984). Polyhistidine mediates an acid-dependent fusion of negatively charged liposomes. *Biochemistry.* 23: 4409-4416.
- Wang W., Dentler W. L. and Borchardt R. T. (2001). VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280: H434-440.
- Wang Y., Boros P., Liu J., Qin L., Bai Y., Bielinska A. U., Kukowska-Latallo J. F., Baker J. R., Jr., et al. (2000). DNA/dendrimer complexes mediate gene transfer into murine cardiac transplants ex vivo. *Mol Ther.* 2: 602-608.
- Ward C. M., Read M. L. and Seymour L. W. (2001). Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy. *Blood.* 97: 2221-2229.
- Wasylnka J. A. and Moore M. M. (2002). Uptake of *Aspergillus fumigatus* Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infect Immun.* 70: 3156-3163.
- Weinbaum S., Zhang X., Han Y., Vink H. and Cowin S. C. (2003). Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 7988-7995.
- White J. M. (1990). Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu Rev Physiol.* 52: 675-697.
- Wilke M., Fortunati E., van den Broek M., Hoogeveen A. T. and Scholte B. J. (1996). Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Ther.* 3: 1133-1142.
- Wilmott R. W., Frenzke M., Kociela V. and Peng L. (1994). Plasma interleukin-1 alpha and beta, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide concentrations during pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 18: 21-27.
- Wiseman J. W., Goddard C. A., McLelland D. and Colledge W. H. (2003). A comparison of linear and branched polyethylenimine (PEI) with DCChol/DOPE liposomes for gene delivery to epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 10: 1654-1662.

- Wojciak-Stothard B., Entwistle A., Garg R. and Ridley A. J. (1998). Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 176: 150-165.
- Woodle M. C., Scaria P., Ganesh S., Subramanian K., Titmas R., Cheng C., Yang J., Pan Y., et al. (2001). Sterically stabilized polyplex: ligand-mediated activity. *J Control Release.* 74: 309-311.
- Wyman T. B., Nicol F., Zelphati O., Scaria P. V., Plank C. and Szoka F. C., Jr. (1997). Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry.* 36: 3008-3017.
- Yang Y., Ertl H. C. and Wilson J. M. (1994). MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity.* 1: 433-442.
- Yilmaz A., Kliche S., Mayr-Beyrle U., Fellbrich G. and Waltenberger J. (2003). p38 MAPK inhibition is critically involved in VEGFR-2-mediated endothelial cell survival. *Biochem Biophys Res Commun.* 306: 730-736.
- Zachary I. (2003). VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans.* 31: 1171-1177.
- Zauner W., Kichler A., Schmidt W., Mechtler K. and Wagner E. (1997). Glycerol and polylysine synergize in their ability to rupture vesicular membranes: a mechanism for increased transferrin-polylysine-mediated gene transfer. *Exp Cell Res.* 232: 137-145.
- Zauner W., Blaas D., Kuechler E. and Wagner E. (1995). Rhinovirus-mediated endosomal release of transfection complexes. *J Virol.* 69: 1085-1092.
- 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. and Davis H. W. (1999). Signaling pathways in thrombin-induced actin reorganization in pulmonary artery endothelial cells. *Exp Lung Res.* 25: 23-39.
- Zhou X. H., Klivanov A. L. and Huang L. (1991). Lipophilic polylysines mediate efficient DNA transfection in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1065: 8-14.

Transport transendothélial de gènes : études dynamiques du passage sélectif de polyplexes au travers de l'endothélium vasculaire pulmonaire.

RESUME :

L'administration systémique de gènes représente une voie intéressante pour le traitement par thérapie génique de la mucoviscidose ou des cancers pulmonaires. Dans cette optique, les polyplexes (complexes ADN/polymère cationique) doivent atteindre le poumon et traverser les vaisseaux sanguins pour transfecter les cellules épithéliales mutées ou les cellules cancéreuses. Il existe peu de données sur le passage transendothélial de polyplexes. Afin d'en améliorer les connaissances, nous avons mis au point un modèle d'endothélium microvasculaire pulmonaire et étudié l'influence de la polarisation cellulaire sur les voies d'internalisation de polyplexes formés avec la polylysine histidylée (pLK-His) et la polyéthylèneimine (PEI), leur efficacité de transfection, leur capacité à traverser la barrière endothéliale et leur adhésion sur la monocouche de cellules endothéliales en conditions de flux. Les travaux réalisés montrent que la polarisation des cellules endothéliales diminue l'internalisation et l'efficacité de transfection des polyplexes pLK-His mais pas celles des polyplexes PEI. Par contre, la polarisation des cellules épithéliales n'a pas d'influence sur l'efficacité des polyplexes pLK-His. Les polyplexes pLK-His et PEI sont capables de traverser la monocouche de cellules endothéliales et transfecter des cellules épithéliales à la fois par leur côté apical et basolatéral. L'incubation des cellules endothéliales avec des cytokines pro-inflammatoires permet d'augmenter ce passage. Enfin, l'adhésion des polyplexes sur les cellules endothéliales est plus importante dans les conditions de flux des microvaisseaux que dans les conditions de flux des veines. L'adhésion des polyplexes PEI est légèrement supérieure à celle des polyplexes pLK-His. Des polyplexes formés avec une PEI sur laquelle a été greffée des motifs de tétraglucose spécifiques des cellules endothéliales adhèrent trois fois plus que les polyplexes formés avec la PEI ce qui montre un ciblage des cellules endothéliales pulmonaires en conditions de flux. L'ensemble des résultats montre qu'il est indispensable de mieux considérer les effets des conditions physiologiques des cellules (polarisation, effets du flux sanguin, conditions d'inflammation) sur la transfection pour concevoir de nouveaux vecteurs synthétiques afin d'améliorer leur efficacité *in vivo*.

MOTS-CLES : Thérapie génique, vecteurs non viraux, endothélium pulmonaire, passage transendothélial, cellules endothéliales humaines de microvaisseaux pulmonaires, cytométrie en flux, microscopie confocale.

Transendothelial crossing of genes : dynamic studies of polyplexes specific crossing over pulmonary endothelium.

ABSTRACT :

The systemic administration of genes represents an interesting way for gene therapy treatment of cystic fibrosis or lung cancer. In this perspective, polyplexes (DNA/cationic polymer complexes) must reach the lung and cross the blood vessels to transfect the CF epithelial cells or tumor cells. Today, there are few data on transendothelial crossing of polyplexes. To improve this knowledge, we have set up a lung microvessel endothelium model and investigated the influence of cell polarisation on the uptake of polyplexes made with the histidylated polylysine (His-pLK) and with the polyethylenimine (PEI), their transfection efficiency, their ability to cross the endothelial barrier and their attachment on the cell monolayer under flow conditions. Our data show that the cell polarization decreased the uptake and the transfection efficiency of His-pLK polyplexes but not PEI polyplexes. On the contrary, polarisation of lung epithelial cells had no influence on the transfection efficiency of His-pLK polyplexes. His-pLK and PEI polyplexes were able to cross the endothelial cells monolayer and to transfect the epithelial cells *via* their apical and basolateral sides. Finally, the polyplexes attachment on endothelial cells was more important in microvessels than in veins flow conditions. The binding of PEI polyplexes was slightly higher than that of His-pLK polyplexes. Polyplexes made with PEI grafted with tetraglucose which exhibited specificity for endothelial cells bound three fold more than PEI polyplexes showing an endothelial cells targeting under flow conditions. Endothelial cells incubation with pro-inflammatory cytokines was found to increase the transendothelial crossing. From our data, it becomes evident that the cells physiological conditions (polarization, blood flow effects, inflammation conditions) must be take in consideration to design smart synthetic vectors for *in vivo* gene delivery.

KEYWORDS : Genic therapy, non viral vectors, pulmonary endothelium, transendothelial crossing, human lung microvessel endothelial cells, flow cytometry, confocal microscopy.

DISCIPLINE : Sciences de la vie.

SPECIALITE DOCTORALE : Biologie Cellulaire et Moléculaire.

ADRESSE DU LABORATOIRE : Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR 4301, rue Charles Sadron 45071 Orléans Cedex 02.