



**HAL**  
open science

# Etude et Développement de Vecteurs Synthétiques pour la Délivrance d'Oligonucléotides à visée thérapeutique.

Sarah Resina

► **To cite this version:**

Sarah Resina. Etude et Développement de Vecteurs Synthétiques pour la Délivrance d'Oligonucléotides à visée thérapeutique.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2007. Français. NNT: . tel-00258262

**HAL Id: tel-00258262**

**<https://theses.hal.science/tel-00258262>**

Submitted on 21 Feb 2008

**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.

**UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

**THÈSE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER II**

*Discipline : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire*

*Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé*

présentée et soutenue publiquement

par

**Sarah RÉSINA**

Le 13 Décembre 2007

***Etude et Développement de Vecteurs Synthétiques pour la Délivrance  
d'Oligonucléotides à Visée Thérapeutique***

**JURY**

Mme Carole LAVIGNE	Professeur, Moncton, Canada	Rapporteur
Mr Patrick MIDOUX	Directeur de Recherche INSERM, Orléans	Rapporteur
Mr Philippe POURQUIER	Directeur R&D, Montpellier	Examineur
Mr Jean-Marie DEVOISSELLE	Professeur, Université de Montpellier I	Examineur
Mr Bernard LEBLEU	Professeur, Université de Montpellier II	Président
Mr Alain R. THIERRY	Professeur Associé, Université de Montpellier II	Directeur de thèse

*A mes parents et ma soeur*

*A Michaël*

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Défenses Antivirales et Antitumorales (directeur Dr. Georges LUTFALLA), devenu laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques (directrice Pr. Catherine BRAUN-BRETON), à Montpellier et a été soutenu financièrement par la société ID-VET et l'ARC.

JE REMERCIE :

Tout d'abord le Dr. Georges LUTFALLA de m'avoir accueilli dans son unité, pour sa sympathie, son soutien et ses conseils avisés.

Chaleureusement le Pr. Bernard LEBLEU de m'avoir accueilli dans son équipe au sein du projet « Contrôle de l'Expression Génétique par les Oligonucléotides Synthétiques : Vectorisation de Biomolécules », pour son implication dans mon travail et d'accepter de juger ma thèse en qualité d'examineur.

Le Dr. Alain THIERRY qui a dirigé cette thèse, de m'avoir transmis ses méthodes de travail, enseigné ses compétences et son savoir-faire dans le domaine des liposomes et aidé à m'améliorer et ce malgré les situations difficiles.

Le Dr. Patrick MIDOUX de m'avoir initié au domaine de la vectorisation et pour son soutien amical depuis le DEA, ainsi que le Pr. Carole LAVIGNE d'avoir accepté de juger cette thèse en qualité de rapporteur.

Le Pr. Jean-Marie DEVOISSELLE et Philippe POURQUIER de me faire l'honneur de faire partie du jury d'examen de cette thèse en qualité d'examineur.

La société ID-VET avec laquelle j'ai eu la chance de collaborer, d'avoir financé la moitié de ma thèse et plus particulièrement Philippe POURQUIER pour sa confiance, sa sympathie et son dynamisme, Stéphanie LESCEU et Loïc COMTET pour leur disponibilité, leur patience et leur précieuse aide.

Tout les membres du département DAA qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions, pour leur sympathie, leur aide et toutes les occasions de « trinquer » : Annie, Camille, Cathy, Danièle, Dina, Emilie, Franck, Georges, Gilles, Paul, Philippe C., Rachida, Richard, Sara et Yacine. Merci à tous ceux qui ont participé de près comme de loin à la réalisation de ce travail.

Tous mes amis rencontrés en thèse pour leurs encouragements, leur écoute, nos galères communes et toutes nos soirées : Anne-Laure, Aurélien, Christelle, Cyrielle, David & Christophe, David T., Emilie, Fabrice, Irena, Joce & Solène, Laurence & Yannick, Loïc, Marianne, Sylvain & Marie, Tony & Mélanie...

Et mes amis fidèles malgré la distance : Anne-Sophie, Christophe R., Cobe & Bab's, Elise & Guillaume, Eric & Vanessa, Lulu, Manu, Marc, Sébastien & Delphine...

Mes beaux-parents : Dominique & Jean-Paul. Merci pour vos conseils et votre soutien, malgré la distance. Merci aussi à toute ma belle-famille de m'avoir acceptée parmi les vôtres.

Ma famille qui m'a toujours encouragé et soutenu dans les études, tant moralement que financièrement : mon père Antonio, ma mère Claudette, ma sœur Sabine et mon frère David. Merci d'avoir cru en moi.

Enfin je remercie ma moitié, Michaël, d'avoir toujours été là dans les meilleurs comme dans les pires moments, pour tes conseils, tes encouragements, ton soutien sans faille, ta patience, ta grande confiance en moi... Merci de croire en moi et de me le montrer. Je te dédie cette thèse.

## SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS</b>	<b>7</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
<b>CHAPITRE 2 : GÉNÉRALITÉS</b>	<b>12</b>
<b>I. CIBLAGE MOLECULAIRE DE L'ARNm.</b>	<b>13</b>
1) L'ARNm.	13
2) La stratégie antisens.	16
a. <i>Définition.</i>	16
b. <i>Modes d'action.</i>	16
c. <i>Développement d'ASO modifiés chimiquement.</i>	18
d. <i>Essais cliniques.</i>	21
3) La stratégie interférence.	22
a. <i>Les siRNA.</i>	23
b. <i>Les miRNA.</i>	27
4) Les ribozymes.	29
5) Les aptamères.	31
<b>II. A LA RECHERCHE D'UNE ADMINISTRATION OPTIMALE.</b>	<b>34</b>
1) Les méthodes physiques et physicochimiques.	36
a. <i>Coprécipitation au phosphate de calcium.</i>	36
b. <i>L'électroporation.</i>	36
c. <i>La micro-injection.</i>	37
d. <i>Le bombardement de gène ou « gene gun ».</i>	37
2) Les vecteurs viraux.	38
a. <i>Les adénovirus.</i>	38
b. <i>Les rétrovirus.</i>	38
3) Les vecteurs synthétiques.	39
a. <i>Les polymères cationiques.</i>	40
b. <i>Les peptides.</i>	43
c. <i>Vecteurs utilisant les lipides.</i>	45
<b>III. LES LIPIDES COMME VECTEURS D'ACIDES NUCLEIQUES.</b>	<b>48</b>
1) Structures des lipides, des liposomes et des lipoplexes.	48
a. <i>Structure des lipides.</i>	48
b. <i>Structure des liposomes.</i>	49
c. <i>Structure des lipoplexes.</i>	51
2) Historique et diversité de lipides dans le contexte du transport d'AN.	52
a. <i>Historique.</i>	52
b. <i>Lipides cationiques dérivés des acides gras.</i>	53
♦ Les lipides monovalents.	53
♦ Les lipides multivalents.	54
c. <i>Lipides cationiques dérivés du cholestérol.</i>	55
♦ Les lipides monovalents.	55
♦ Les lipides multivalents.	56
d. <i>Lipides neutres.</i>	56
3) Techniques de formulation des liposomes.	58

a.	<i>Méthode conventionnelle.</i>	59
b.	<i>Inversion de phase.</i>	59
c.	<i>Dialyse de détergent.</i>	59
d.	<i>Injection à l'éther.</i>	60
e.	<i>Déshydratation / réhydratation.</i>	60
f.	<i>Injection à l'éthanol.</i>	60
g.	<i>Chauffage.</i>	61
h.	<i>Extrusion.</i>	61
i.	<i>Congélation / décongélation.</i>	61
j.	<i>Sonication.</i>	62
4)	Mécanismes d'entrée dans la cellule.	62
a.	<i>Endocytose.</i>	63
b.	<i>Fusion.</i>	64
c.	<i>Pénétration dans le noyau.</i>	65
5)	Limitations.	65
6)	Liposomes liés à des polymères cationiques.	67
7)	Liposomes liés à des peptides.	69
8)	Applications et utilisation en thérapie génique.	71
<b>IV.</b>	<b>UTILISATION ET APPLICATIONS DES DLS ET DES NEUTRAPLEX.</b>	<b>73</b>
1)	Historique du développement des DLS et des Neutraplex	73
a.	<i>Les DLS.</i>	73
b.	<i>Les Neutraplex.</i>	75
2)	Application aux ON antisens : correction de l'épissage alternatif anormal.	77
a.	<i>La <math>\beta</math>-thalassémie.</i>	77
b.	<i>Le modèle de Ryszard Kole.</i>	78
c.	<i>Les oligonucléotides modifiés.</i>	81
3)	Application aux siRNA : inhibition de PAI-1 dans le contexte d'une approche anticancéreuse.	82
a.	<i>Le système PAs.</i>	82
b.	<i>Implication de PAI-1 dans la migration cellulaire.</i>	83
c.	<i>Implication de PAI-1 dans l'angiogénèse tumorale.</i>	84
<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS</b>		<b>86</b>
<b>ARTICLE I</b>		<b>87</b>
I.	<b>INTRODUCTION.</b>	88
II.	<b>CONTRIBUTION.</b>	89
III.	<b>CONCLUSION.</b>	89
IV.	<b>ARTICLE I.</b>	90
<b>ARTICLE II</b>		<b>91</b>
I.	<b>INTRODUCTION.</b>	92
II.	<b>CONTRIBUTION.</b>	92
III.	<b>CONCLUSION.</b>	93
IV.	<b>ARTICLE II.</b>	94
<b>ARTICLE III</b>		<b>95</b>
I.	<b>INTRODUCTION.</b>	96
II.	<b>CONTRIBUTION.</b>	97
III.	<b>CONCLUSION.</b>	97
IV.	<b>ARTICLE III.</b>	98
<b>ARTICLE IV</b>		<b>99</b>
I.	<b>INTRODUCTION.</b>	100
II.	<b>CONTRIBUTION.</b>	100
III.	<b>CONCLUSION.</b>	100
IV.	<b>ARTICLE IV.</b>	101

---

<b>ARTICLE V</b>	<b>103</b>
<i>I. INTRODUCTION.</i>	104
<i>II. CONTRIBUTION.</i>	106
<i>III. CONCLUSION.</i>	106
<i>IV. ARTICLE V.</i>	109
<b><u>CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u></b>	<b>139</b>
<i>I. FORMULATIONS.</i>	140
<i>II. PENETRATION DES LIPOPLEXES.</i>	143
<i>III. CORRECTION DE L'EPISSAGE ALTERNATIF ET MODULATION DE L'EXPRESSION DU TRANSGENE.</i>	145
<i>IV. DELIVRANCE DE siRNA.</i>	146
<i>V. PEPTIDES VERSUS LIPOPLEXES.</i>	147
<i>VI. EVOLUTION DES LIPOSOMES.</i>	149
<i>VII. PERSPECTIVES GENERALES.</i>	150
<i>VIII. CONCLUSION.</i>	152
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>153</b>



## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

<u>Figure 1</u> : comparaison de diverses stratégies pour inhiber une protéine.	13
<u>Figure 2</u> : principales étapes de l'épissage.	15
<u>Figure 3</u> : modes d'action des oligonucléotides antisens.	18
<u>Figure 4</u> : diverses modifications chimiques des oligonucléotides antisens.	19
<u>Figure 5</u> : étapes de l'ARN interférence menant à l'extinction d'un gène ciblé.	24
<u>Figure 6</u> : mécanisme d'action des miRNA.	28
<u>Figure 7</u> : structure secondaire d'un ribozyme Hammerhead.	30
<u>Figure 8</u> : principe général de la méthode SELEX.	32
<u>Figure 9</u> : essais cliniques concernant les diverses stratégies antisens, interférence, ribozymes et aptamères.	34
<u>Figure 10</u> : essais cliniques concernant les divers vecteurs utilisés en thérapie génique.	36
<u>Figure 11</u> : structure des principaux polymères cationiques linéaires et branchés.	41
<u>Figure 12</u> : images de synthèse d'un polymère de type nanocapsule et de type nanosphère.	42
<u>Figure 13</u> : images de synthèse d'un liposome et d'un liposome pégylé.	46
<u>Figure 14</u> : structure générale d'un lipide cationique.	48
<u>Figure 15</u> : organisation des lipides.	49
<u>Figure 16</u> : classification des liposomes.	50
<u>Figure 17</u> : ultrastructure d'un complexe liposome cationique / ADN.	51
<u>Figure 18</u> : structure de lipides cationiques dérivés d'acides gras.	55
<u>Figure 19</u> : structure d'un lipide cationique dérivé du cholestérol.	56
<u>Figure 20</u> : structure de lipides neutres.	57
<u>Figure 21</u> : principales étapes d'entrée d'un liposome cationique complexé avec un acide nucléique dans la cellule.	63
<u>Figure 22</u> : structures chimiques de l'ADN (chargé négativement) et du PNA (neutre).	71
<u>Figure 23</u> : hypothèse de la formation des lipoplexes à partir de vésicules lipidiques et d'acides nucléiques.	73
<u>Figure 24</u> : images de cryo-microscopie électronique de particules DLS et de complexes DLS-ADN plasmidique.	74
<u>Figure 25</u> : particules de DLS et de DLS-oligonucléotides.	75
<u>Figure 26</u> : structure de la cardiolipine.	76
<u>Figure 27</u> : image de cryo-microscopie électronique d'une particule multilamellaire de Nx-ADNp ; schéma réalisé à partir des observations en cryo-microscopie électronique, d'une portion de Nx-ADNp.	77
<u>Figure 28</u> : carte du plasmide pRec2-705.	79

---

<u>Figure 29</u> : modèle de correction de l'épissage alternatif avec des oligonucléotides antisens.	80
<u>Figure 30</u> : comparaison entre les systèmes de correction de l'épissage alternatif et de saut d'exon.	80
<u>Figure 31</u> : structures chimiques de divers oligonucléotides utilisés pour corriger l'épissage alternatif déficient.	82
<u>Figure 32</u> : système PAs.	83
<u>Figure 33</u> : extinction de la protéine PAI-1 sécrétée obtenue en présence ou en absence de sérum dans le milieu de transfection.	98
<u>Figure 34</u> : particules de Nx complexées à diverses quantités d'oligonucléotides-FITC (fluorescence verte) ou oligonucléotides-Alexa <sub>546</sub> (fluorescence rouge).	104
<u>Figure 35</u> : distribution de la luciférase après injection de DLS-pTG11033, en fonction du temps.	145
<u>Tableau 1</u> : essais cliniques des oligonucléotides antisens.	21
<u>Tableau 2</u> : essais cliniques des siRNA.	27
<u>Tableau 3</u> : essais cliniques des ribozymes.	31
<u>Tableau 4</u> : essais cliniques des aptamères.	33
<u>Tableau 5</u> : principaux procédés utilisés pour le transfert d'acides nucléiques.	35
<u>Tableau 6</u> : exemples de polymères cationiques.	40
<u>Tableau 7</u> : exemples de peptides vecteurs.	44
<u>Tableau 8</u> : exemples de lipopolyplexes utilisés pour la transfection.	68
<u>Tableau 9</u> : essais cliniques des liposomes dans le cadre de la thérapie génique.	72
<u>Tableau 10</u> : conditions des expériences pour évaluer la part de transport actif, de transport passif et de fixation à la membrane des lipoplexes.	105
<u>Tableau 11</u> : récapitulatif des mécanismes observés en fonction de la charge des lipoplexes et du milieu de transfection.	108
<u>Tableau 12</u> : propriétés biophysiques des formulations de liposomes ou de lipoplexes, réalisées à partir de DLS et de Neutraplex.	141
<u>Tableau 13</u> : avantages et inconvénients actuels des 2 stratégies de vectorisation testées.	148
<u>Tableau 14</u> : applications possibles des complexes liposomes-oligonucléotides pour les traitements de maladies génétiques et de cancers.	152

---

**LISTE DES PUBLICATIONS**

Thierry A.R., Abes S., Resina S., Travo A., Richard J.-P., Prevot P. and Lebleu B. Comparison of basic peptides- and lipid-based strategies for the delivery of splice correcting oligonucleotides.

*Biochimica Biophysica Acta*, 2006;**1758**(3):364-374.

Resina S., Kole R., Travo A., Lebleu B. and Thierry A.R. Switching on transgene expression by correcting aberrant splicing with using multi-targeting steric block oligonucleotides.

*Journal of Gene Medicine*, 2007;**9**(6):498-510.

Meryet-Figuières M., Resina S., Lavigne C., Barlovatz-Meimón G., Lebleu B. and Thierry A.R. Inhibition of PAI-1 Expression in Breast Cancer Carcinoma Cells by siRNA at nanomolar range.

*Biochimie* 2007;**89**(10):1228-1233.

Resina S., Abes S., Turner J.J., Prevot P., Travo A., Clair P., Gait M.J., Thierry A.R. and Lebleu B. Lipoplex and peptide-based strategies for the delivery of steric-block oligonucleotides.

*International Journal of Pharmaceutics*, 2007; **344**(1-2):96-102.

Resina S., Prevot P., Lebleu B. and Thierry A.R. The physico-chemical properties of the lipoplexes effect the mechanisms of cell uptake and their oligonucleotide transfection activity.

*En préparation.*

**LISTE DES ABBREVIATIONS**

<u>2'-ACE</u>	Bis(2-acétoxyéthoxy)méthyl
<u>2'-O-Me</u>	2'-O-méthyl
<u>7<sub>m</sub>GMP</u>	7-méthylguanine monophosphate
<u>AA</u>	acide aminé
<u>AAV</u>	virus associés aux adénovirus
<u>ADN</u>	Acide DésoxyriboNucléique
<u>ADNp</u>	ADN plasmidique
<u>AMD</u>	Dégénérescence Maculaire liée à l'Age
<u>AMP</u>	Adénine monophosphate
<u>AN</u>	acides nucléiques
<u>Antp</u>	antennapedia
<u>ARN</u>	Acide RiboNucléique
<u>ARNi</u>	ARN interférence
<u>ARNm</u>	ARN messenger
<u>ASO</u>	oligonucléotide antisens
<u>CFTR</u>	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
<u>CL</u>	cardiolipine
<u>Chol</u>	cholestérol
<u>CMV</u>	CytoMégaloVirus
<u>CPP</u>	Cell Penetrating Peptide
<u>Da</u>	Dalton
<u>DC-chole</u>	3-bêta [N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]cholestérol
<u>DLS</u>	Delivery Liposomal System
<u>DDAB</u>	Diméthyl dioctadécyl ammonium bromide
<u>DOGS</u>	Dioctadécyl Amido Glyco Spermine
<u>DOPC</u>	Dioléoyl phosphatidyl choline
<u>DOPE</u>	DiOleoyl L- $\alpha$ PhosphatidylEtanolamine
<u>DOSPA</u>	2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminocarboxamido)éthyl]N,N-diméthyl 1-propananium trifluoroacétate
<u>DOSPER</u>	1,3-dioléoyloxy-2-(6-carboxy-spermyl)-propylamide
<u>DOTAP</u>	1,2-dioléoyloxy-3-(triméthylammonio) propane
<u>DOTMA</u>	1,2-dioléoyloxypropyl-3-triméthylammonium
<u>EGFP</u>	Enhanced Green Fluorescent Protein
<u>FGF-2</u>	facteur de croissance des fibroblastes de type 2
<u>FITC</u>	Fluorescéine IsoThioCyanate
<u>GUV</u>	vésicules unilamellaires géantes
<u>H<sub>I</sub></u>	particule hexagonale normale
<u>H<sub>II</sub></u>	particule hexagonale inverse
<u>HGMD</u>	Human Gene Mutation Database
<u>HIV</u>	Virus d'Immunodéficience acquise Humain
<u>HSV</u>	Virus Simplex de l'Herpès
<u>L<sub><math>\alpha</math></sub></u>	particule lamellaire
<u>LF</u>	lipofectine
<u>LFA</u>	lipofectamine
<u>LNA</u>	Locked nucleic acids
<u>LUV</u>	larges vésicules unilamellaires
<u>Lx</u>	Lipoplexe

---

<u>Mdr</u>	gène de Résistance Multi Drogue
<u>miRNA</u>	micro ARN interférents
<u>MLV</u>	vésicules multilamellaires
<u>MOE</u>	2'-O-méthoxyéthyl phosphorothioate
<u>Nx</u>	Neutraplex
<u>ON</u>	oligonucléotide
<u>PAI-I</u>	inhibiteur du plasminogène de type 1
<u>PAMAM</u>	polyamindodendrimères
<u>PAs</u>	système activateur du plasminogène
<u>PC</u>	phosphatidylcholine
<u>PCR</u>	Réaction de Polymérisation en Chaîne
<u>PEG</u>	PolyEthylène Glycol
<u>PEI</u>	PolyEthylèneImine
<u>PET</u>	Tomographie par Emission de Positons
<u>PMO</u>	Phosphorodiamidate Morpholino Oligomère
<u>PNA</u>	Peptide Nucleic Acid
<u>pré-ARNm</u>	ARN pré-messenger
<u>PS</u>	phosphorothioate
<u>RISC</u>	RNA-Induced Silencing Complex
<u>SAXS</u>	analyse au rayon X à petits angles
<u>SELEX</u>	méthode d'Evolution Systématique des Ligands par Enrichissement Exponentielle
<u>SERPIN</u>	super famille des inhibiteurs de sérine protéase
<u>siRNA</u>	petits ARN interférents
<u>shRNA</u>	petits ARN « en épingle à cheveux »
<u>RNP</u>	Complexe ribonucléoprotéique
<u>SUV</u>	petites vésicules unilamellaires
<u>TAT</u>	facteur activateur de la transcription chez le HIV-1
<u>TLR</u>	Récepteur Toll-Like
<u>Tm</u>	Température de transition de phase
<u>uPA</u>	urokinase activatrice du plasminogène
<u>uPAR</u>	récepteur de l'urokinase
<u>UTR</u>	Région non codante
<u>VEGF</u>	facteur de croissance de l'épithélium vasculaire

# **CHAPITRE 1 : INTRODUCTION**

Le transfert de gène ou plus généralement la thérapie génique, est une approche thérapeutique proposant d'utiliser des acides nucléiques (ADN, ARN, oligonucléotides) comme médicament.

○ La première stratégie consiste à remplacer un gène déficient par son homologue fonctionnel. Celle-ci implique que la maladie à traiter soit due à une anomalie de faible ampleur sur un seul chromosome, qu'on puisse cibler le gène en question avec un gène réparateur et que ce dernier puisse s'insérer dans le génome des cellules. Cette stratégie n'est pas envisageable dans l'état actuel des connaissances.

○ La seconde stratégie consiste à ajouter un gène dans le génome de l'hôte. Ce gène peut s'insérer (au hasard) ou non dans le génome. Il permet la production d'une protéine thérapeutique ou antigénique.

○ La troisième stratégie, en pleine expansion, consiste au contraire à réguler l'expression d'un gène endogène, impliquée dans une pathologie. Le gène véhiculé permet ici d'inhiber ou de restaurer la production de la protéine correspondante en ciblant l'ARNm.

Dans les 2 dernières stratégies, le gène est un médicament ou un vaccin. C'est dans cette perspective que se situent les travaux que j'ai entrepris.

Un des plus grands obstacles au développement du transfert cellulaire d'acide nucléiques est l'absence de vecteurs efficaces et non toxiques. Les premiers vecteurs développés, dérivés des virus, restent incontournables en terme d'efficacité, mais leurs avantages se réduisent désormais face au contrecoup de la démonstration de leur potentiel toxique. D'autre part, de nouvelles générations des vecteurs synthétiques, parmi lesquels les liposomes cationiques occupent la première place, concilient facilité d'utilisation mais surtout sécurité et efficacité de plus en plus importante.

Dans le cadre de la thématique de la vectorisation, le travail présenté dans ce mémoire consiste en l'optimisation et l'utilisation de liposomes cationiques pour le transport d'oligonucléotides simple-brin, dans un modèle *in vitro* de correction d'épissage alternatif anormal ( $\beta$ -thalassémie), et double-brin dans un modèle d'inhibition de l'expression génique dans des cellules de cancer du sein.

Dans le laboratoire, nous avons l'avantage de développer 2 types de vecteurs synthétiques très différents : les peptides et les liposomes, chacun ayant ses points forts et ses

inconvenients. L'intérêt de cette étude a aussi été de comparer les 2 stratégies permettant la délivrance d'ON dans les cellules *in vitro*.

○ Dans le chapitre des généralités, j'exposerai les diverses stratégies permettant de cibler l'ARNm au niveau moléculaire puis je citerai les techniques de vectorisation actuelles, permettant le transport d'une molécule d'intérêt. Je présenterai ensuite les lipides et les liposomes comme vecteurs d'acides nucléiques, en décrivant leurs structures, leur diversité, les diverses techniques de formulation permettant de les préparer, puis leurs mécanismes d'entrée dans la cellule et leurs limitations. Je décrirai par la suite les applications des systèmes de délivrance DLS et des Neutraplex, liposomes développés et optimisés dans cette étude.

○ Dans le chapitre des résultats, j'exposerai les résultats obtenus qui ont fait l'objet de 4 articles publiés et un en préparation. J'y présenterai les résultats sur l'optimisation de la délivrance de divers analogues d'oligonucléotides par des liposomes cationiques et la comparaison entre la vectorisation par les peptides et les liposomes, dans le modèle cellulaire de correction de l'épissage alternatif anormal. Je décrirai aussi l'inhibition de la protéine PAI-1, impliquée dans la progression du cancer du sein, par des siRNA spécifiques vectorisés par les DLS. Enfin, je montrerai nos résultats récents sur le développement de lipoplexes anioniques et sur l'étude des voies d'internalisation des complexes.

○ Après une discussion générale, j'annoncerai différentes perspectives offertes par ces travaux et je conclurai brièvement.

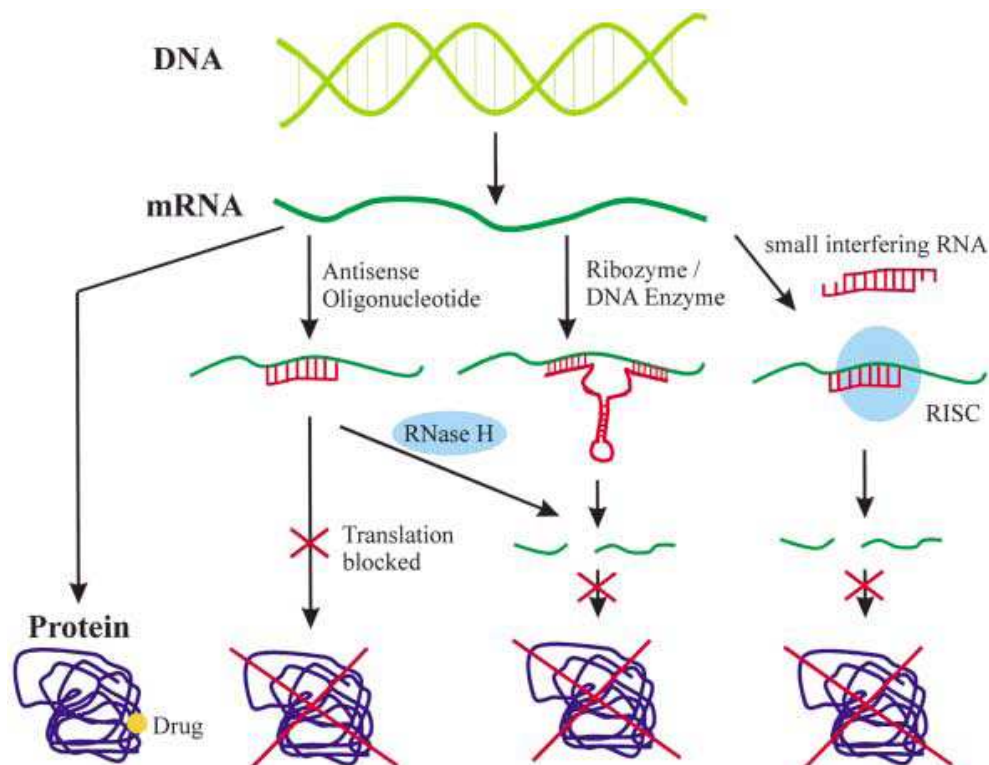


## **CHAPITRE 2 : GÉNÉRALITÉS**

## I. CIBLAGE MOLECULAIRE DE L'ARNm.

La plupart des stratégies pour agir sur la synthèse d'une protéine cible proposent d'agir en amont de la protéine en bloquant la traduction (voir Figure 1). A l'inverse, les drogues conventionnelles se lient directement aux protéines pour moduler leur expression.

**Figure 1** : comparaison de diverses stratégies pour inhiber une protéine.  
D'après Kurreck 2003.



### 1) L'ARNm.

Dans les cellules eucaryotes, on assiste à différents transferts d'informations :

1. ADN  $\rightarrow$  ADN : c'est la réplication ou duplication, nécessaire à la conservation de l'information génétique ;
2. ADN  $\rightarrow$  ARN : c'est la transcription, permettant le passage de l'information de l'ADN en ARN ;
3. ARNm  $\rightarrow$  protéines : c'est la traduction, permettant la synthèse de protéines, grâce à l'information contenue dans les ARNm.

Les 2 premières étapes ont lieu dans le noyau des cellules, la 3<sup>ème</sup> a lieu dans le cytoplasme après translocation des ARNm.

La transcription est le passage de l'ADN en pré-ARNm non fonctionnel. Pour devenir mature et constituer un ARNm fonctionnel, le pré-ARNm doit subir 3 étapes de maturation.

*a. L'ajout d'une coiffe en 5' du brin.*

La coiffe ou « cap » consiste en l'ajout d'un nucléoside guanylique : c'est une 7-méthyl-guanine monophosphate en position inversée ou  $7_m\text{GMP}$ , ajoutée en 5' du brin du pré-ARNm et reliée au 1<sup>er</sup> nucléotide. Cette étape, aussi appelée « capping », intervient précocement au cours de la transcription. La coiffe a une fonction protectrice vis-à-vis des phosphatases et des exonucléases, mais elle est aussi indispensable à l'initiation de la traduction. L'extrémité 5' coiffée peut ensuite faire l'objet de plusieurs méthylation.

*b. La queue de polyadénylation en 3' du brin.*

Il existe en 3' du brin du pré-ARNm une séquence consensus riche en arginine, dite de polyadénylation : AAUAAA. Une vingtaine de nucléotides sont clivés par une endonucléase, en aval de cette séquence consensus. Ensuite, la poly(A) polymérase ajoute en 3' du brin une succession de 80 à 300 A chez les eucaryotes : c'est la queue poly(A). Bien que clivage et polyadénylation soient liés, les 2 réactions sont catalysées par des enzymes distinctes, au sein d'un complexe qui fait également intervenir une particule ribonucléoprotéique renfermant un petit ARN nucléaire riche en uridine (U1).

Ces 2 modifications sont cruciales pour rendre l'ARNm efficace pour son exportation nucléaire, sa traduction, ainsi que pour maintenir sa stabilité (pour revue Wilusz *et al.* 2001).

*c. L'épissage.*

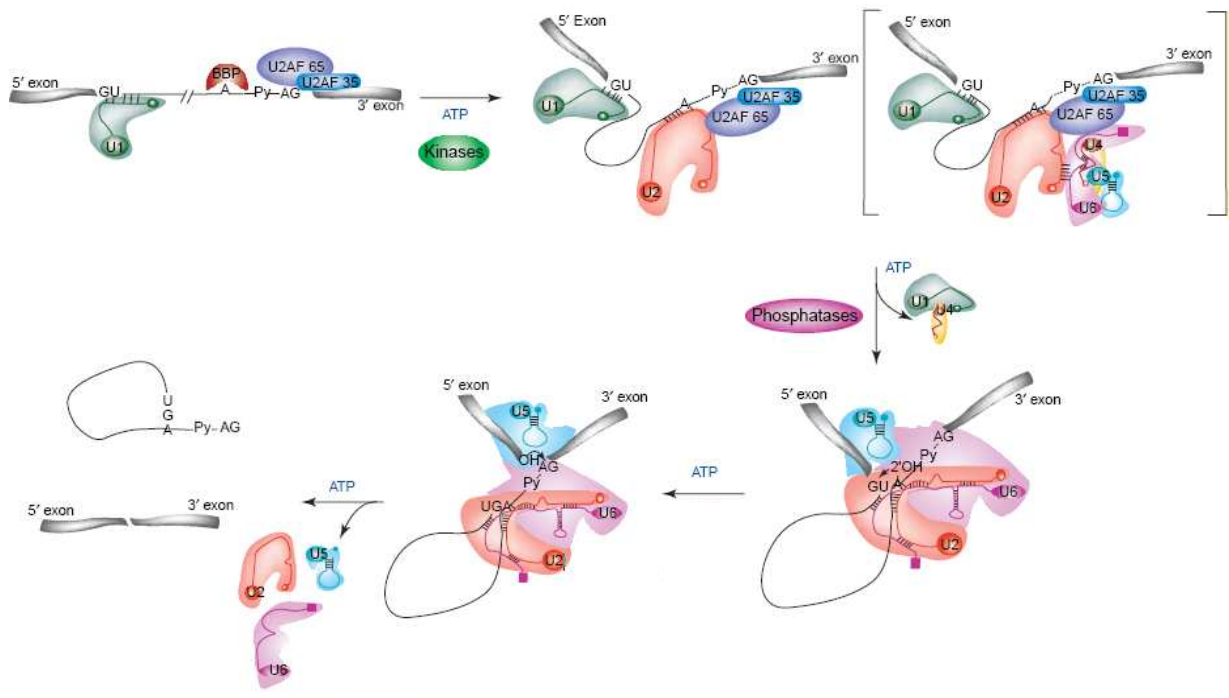
La dernière étape de maturation a pour but d'exciser les introns présents au sein du pré-ARNm. Ce mécanisme est catalysé par un complexe ribonucléoprotéique (snRNP) d'environ 60S, appelé spliceosome, qui se positionne au niveau de l'intron à exciser. Cette enzyme fait intervenir les petits ARN U1, U2, U4, U5 et U6 associés à des protéines, dans 5 étapes principales (voir Figure 2).

Des séquences nucléotidiques consensus au niveau des jonctions exon-intron et à l'intérieur de l'intron ont été mises en évidence :

- le doublet AG ou site donneur d'épissage
- le doublet GU ou site accepteur d'épissage

- site de branchement : un AMP situé à 20-50 nucléotides de l'extrémité 3' de l'intron, qui intervient dans la formation d'une boucle.

**Figure 2 : principales étapes de l'épissage.**  
D'après Tazi et al. 2005.



Il y a tout d'abord un clivage en 5' de l'intron en amont du site donneur d'épissage GU. Le GMP engage son 5'P (phosphate) dans une liaison covalente avec le 2'OH du A de branchement, formant ainsi une structure en boucle. Il y a ensuite un clivage à l'extrémité 3' de l'intron, constituée par le site accepteur d'épissage AG. Il se crée enfin une liaison du 3'OH de l'exon amont avec le 5'P de l'exon aval.

L'extrémité 5' (coiffe) de l'ARNm ou région 5'-UTR (« untranslated region » : région non traduite) et l'extrémité 3' ou région 3'-UTR (queue poly(A)) sont des séquences non codantes. L'ensemble des exons constitue la région codante pour la protéine.

Il existe plusieurs stratégies pour agir sur la synthèse d'une protéine cible :

- au niveau du pré-ARNm (pré-ARN messenger) : oligonucléotides antisens (ASO)
- au niveau l'ARNm (ARN messenger) : ASO, ARN interférence (ARNi), ribozymes
- au niveau de la protéine : aptamères.

## 2) La stratégie antisens.

### a. *Définition.*

La thérapie antisens est une application particulière et rationnelle basée sur la chimie des ON. En 1978, Zamecnik et Stephenson (Zamecnik *et al.* 1978) ont appliqué pour la 1<sup>ère</sup> fois cette stratégie, démontrant qu'un ON antisens inhiberait la réplication du virus du sarcome de Rous dans un système cellulaire. Le principe impliqué par cette approche était simple : l'inhibition de l'expression d'un gène spécifique au niveau de l'ARN peut être atteint en utilisant des ON complémentaires, appelés oligonucléotides antisens (ASO), ce qui bloquerait l'expression de la protéine encodée par l'ARN cible. Si les protéines inhibées sont liées à des maladies, alors les ASO deviennent une nouvelle classe de médicaments (Gallo *et al.* 2003). Les ASO constituent un outil utile pour étudier les pertes de fonction des gènes et les validations de cible, mais c'est également une nouvelle stratégie thérapeutique potentielle pour traiter les maladies liées à la dérégulation de l'expression génique (Chan *et al.* 2006).

L'ASO est un court déoxyribonucléotide simple-brin de 15 à 20 bases. En théorie, l'hybridation d'un ASO sur l'ARNm complémentaires de type appariement Watson-Crick, devrait être de haute spécificité. De plus, cette stratégie offre une approche thérapeutique générale puisque toutes les protéines sont synthétisées selon le même mécanisme : l'ARNm est l'intermédiaire de l'information et sert de matrice pour la synthèse de la protéine par le ribosome.

De nombreuses études ont démontré la capacité des ASO à bloquer la fonction de gènes spécifiques *in vitro* et *in vivo*. Ces molécules sont étudiées comme agents thérapeutiques pour traiter les infections virales, les cancers, les maladies immunologiques, les maladies génétiques et plusieurs essais cliniques sont en cours à ce jour (<http://clinicaltrials.gov/ct/gui> ; Chan *et al.* 2006).

### b. *Modes d'action.*

L'hybridation de l'ASO peut mener à l'arrêt de la traduction de l'ARNm cible par blocage stérique ou à sa destruction ciblée par recrutement de la RNase H intracellulaire qui clive alors l'ARNm cible au niveau du site du duplexe ARN / ADN. Elle peut aussi interférer avec la maturation de l'ARNm en inhibant l'épissage et en déstabilisant le pré-ARNm dans le noyau (Kurreck 2003, Chan *et al.* 2006). Cette enzyme dégrade l'ARNm et l'ON devient

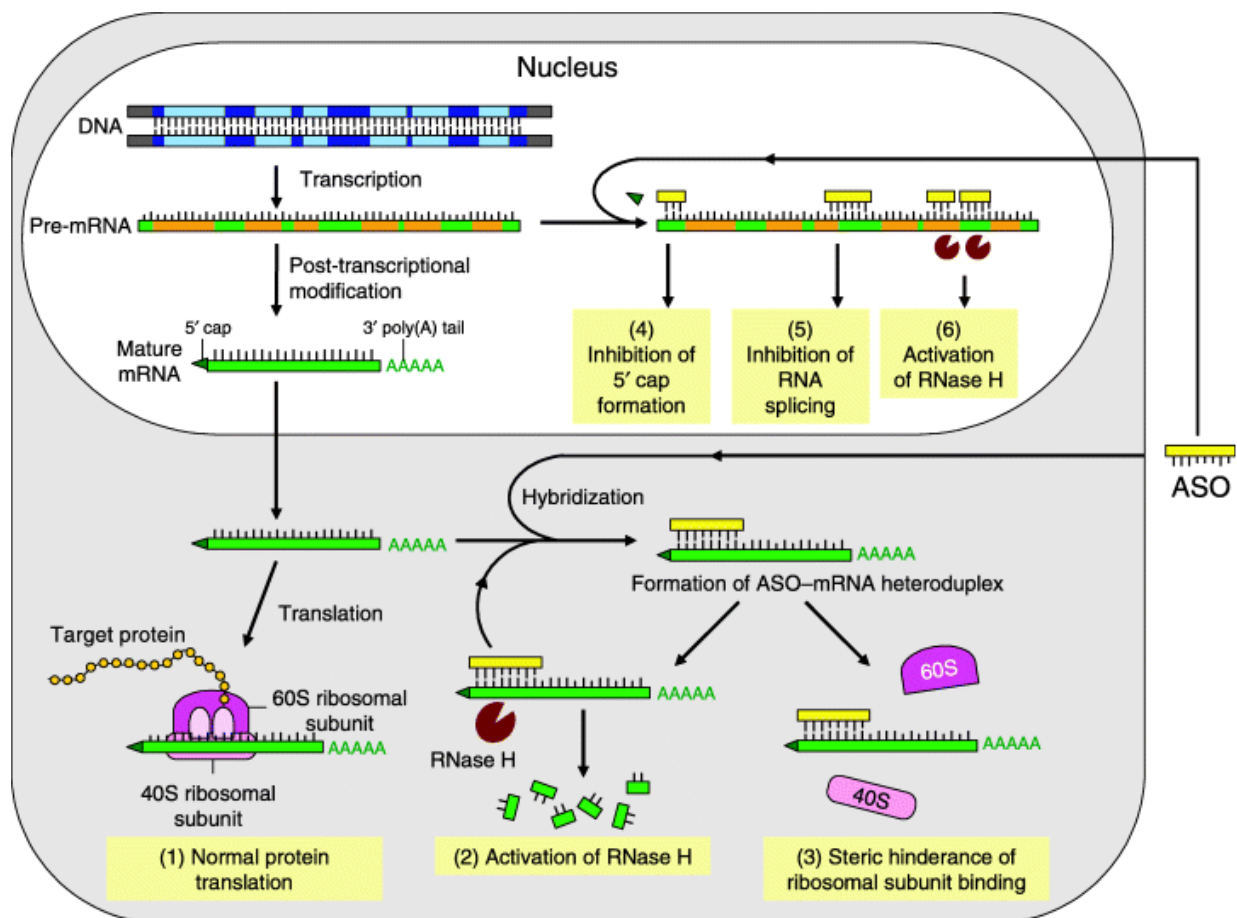
disponible pour un nouvel ARNm cible, ce qui peut produire et augmenter l'activité biologique (Wu *et al.* 2004). Cette enzyme est aussi très sensible aux altérations structurales des ASO et la plupart des modifications ne sont pas compatibles avec ce mécanisme. De plus, cette enzyme aurait aussi des actions non spécifiques (Gallo *et al.* 2003).

La longueur et la stabilité des interactions entre les ASO et l'ARNm cible complémentaire dépendent de facteurs comme la stabilité thermodynamique, la structure secondaire de l'ARNm cible transcrit et la proximité entre le site d'hybridation et les motifs fonctionnels sur le transcrit, comme la région 5' CAP ou le site de début de traduction (Chan *et al.* 2006). Plusieurs paramètres entrent en jeu pour augmenter le taux d'hybridation :

- la prédiction de la structure secondaire de l'ARN,
- l'identification des structures locales secondaires préférables sur l'ARN,
- la présence de motifs et le taux de GC,
- le calcul de l'énergie de liaison.

Ainsi, en absence d'ASO (voir Figure 3), l'expression normale du gène et de la protéine correspondante sont maintenues (1). Une fois dans la cellule, l'ASO peut s'hybrider sur l'ARNm cible dans le cytoplasme. La formation d'un hétéroduplexe entre l'ASO et l'ARNm (2) induit l'activation de la RNase H, conduisant à une dégradation sélective de l'ARNm ou interférant stériquement avec l'assemblage du ribosome (3). Ces 2 actions résultent en une diminution de la synthèse de la protéine. En parallèle, l'ASO peut entrer dans le noyau et réguler la maturation de l'ARNm, en inhibant la formation de la CAP en 5' (4), en inhibant l'épissage de l'ARNm (5) et en activant la RNase H (6).

**Figure 3 : modes d'action des ASO.** D'après Chan et al. 2006.



*c. Développement d'ASO modifiés chimiquement.*

Les changements au niveau des sucres influence l'activation de la RNase H (2'-fluoro, 2'-méthyl, 2'-méthoxy). Les ON ainsi modifiés ne recruteraient pas l'enzyme ubiquitaire (Kawasaki *et al.* 1993, Sproat *et al.* 1989). Les modifications de l'orientation du sucre sur la base peuvent aussi affecter l'activation de la RNase H (Morvan *et al.* 1991, Gagnor *et al.* 1989). De plus, les changements du squelette influencent la capacité des ON à activer la RNase H (Crooke 2004). Les modifications des ASO peuvent donc se faire à 3 niveaux : au niveau des bases, au niveau des riboses (2'OH) et au niveau du squelette (phosphate). De ce fait, on peut regrouper les ASO en 2 catégories :

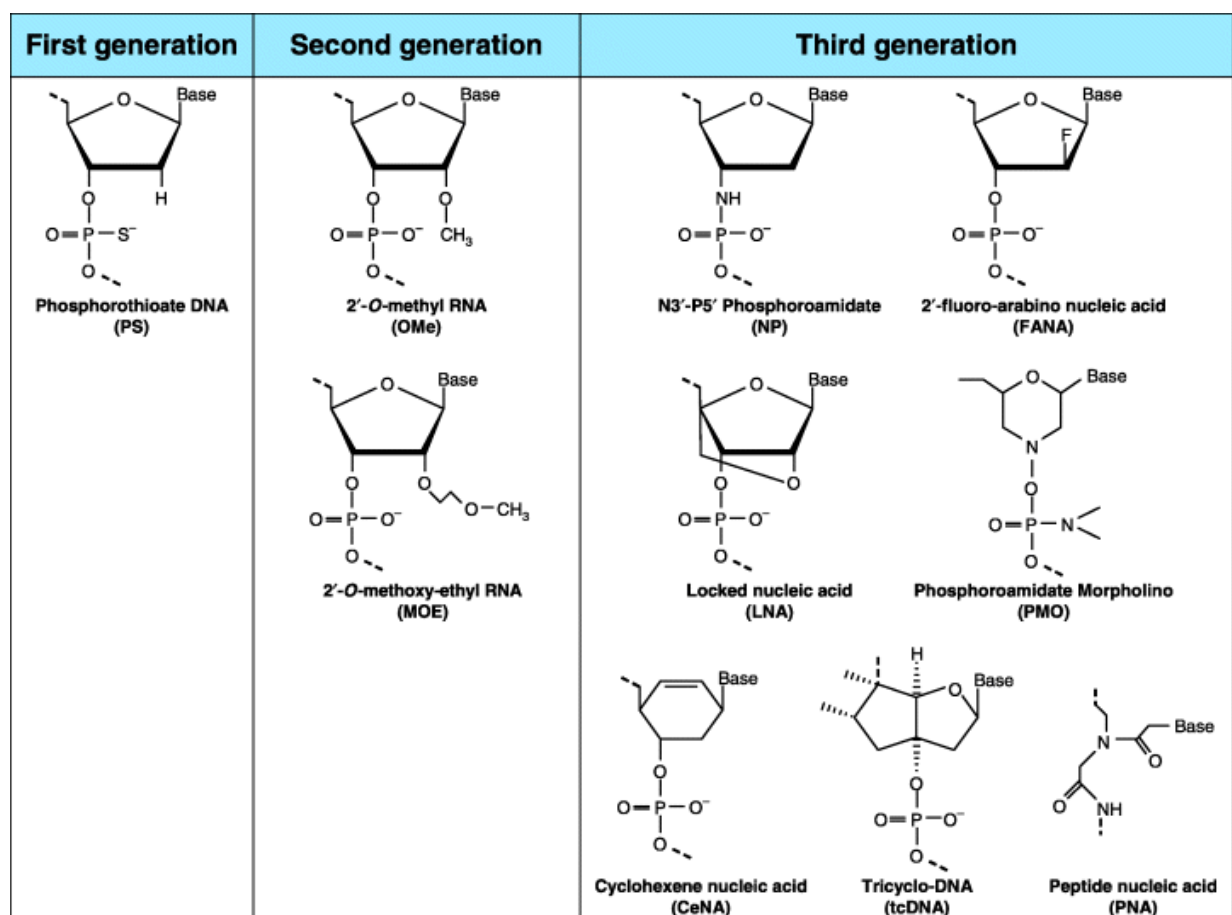
- les « cliveurs » activant la RNase H
- les bloqueurs n'activant pas la RNase H.

Les 1<sup>ères</sup> tentatives ont utilisé des ON phosphodiester non modifiés, mais ceux-ci se sont avérés rapidement clivés par les nucléases dans les milieux biologiques. Pour pallier à ce

problème, des efforts considérables ont été réalisés pour développer des analogues d'ON plus stables, avec une demi-vie *in vivo* plus longue (Stein 1998).

Le développement d'ON modifiés chimiquement est un processus complexe puisqu'en plus de la résistance aux nucléases, des duplexes stables doivent être obtenus. Ces modifications peuvent concerner le squelette et / ou les sucres (Luyten *et al.* 1998, Herdewijn 2000). L'importance de l'hybridation peut être démontrée par la corrélation de l'activité antisens observée *in vitro* et *in vivo*, avec l'affinité d'hybridation exprimée comme le  $T_m$  (Zelleger *et al.* 2001, Altmann *et al.* 1996).

**Figure 4 : diverses modifications chimiques des ASO.** D'après Chan *et al.* 2006.



Les ON avec un squelette PS ont ensuite été développés et constituent la 1<sup>ère</sup> génération d'ASO. Les atomes d'oxygène du squelette phosphodiester sont remplacés par des atomes de soufre (Eckstein 2000). Ces ON confèrent une plus grande résistance aux nucléases que les ON phosphodiesters, mais ont cependant une affinité de liaison assez faible pour l'ARN et une diminution du  $T_m$  (Chan *et al.* 2006). Ils sont aussi capables d'activer la RNase



H et offrent des propriétés de pharmacocinétique favorables. Le développement de ces ASO souffre cependant d'une certaine activité non séquence spécifique (Lavigne *et al.* 2002). Des effets secondaires ont aussi été observés chez l'animal de laboratoire et seraient dépendants de la séquence de l'ON (Agrawal 1999, Gallo *et al.* 2003). Les PS-ON ont donc été associés à d'autres modifications chimiques d'ON. Vitravene<sup>TM</sup> (ou Fomivirsén, ISIS 2922), le 1<sup>er</sup> médicament antisens approuvé par la « Food and Drug Administration » aux Etats-Unis, est un PS-ON destiné au traitement de la rétinite induite par le CMV, chez les patients immunodéprimés (Geary *et al.* 2002).

La 2<sup>nd</sup>e génération d'ASO est constituée principalement des 2'-O-méthyl (2'O-Me) et 2'-O-méthoxyéthyl (MOE) ON. Ces modifications concernent les sucres en position 2', remplacés par des 2'-alkyl au niveau des riboses. Le squelette peut être de type phosphodiester ou PS. Ces ASO offrent une plus grande résistance aux nucléases et une plus grande affinité pour l'ARNm cible. Ces analogues n'entraînent pas le clivage de l'ARNm par la RNase H, ce qui tempère leur efficacité (Altmann *et al.* 1996). Par contre, cette propriété en fait des ON de choix pour leurs applications dans des modèles de correction de l'épissage alternatif ou de saut d'exon, *in vitro* et *in vivo* :  $\beta$ -thalassémie, dystrophie musculaire de Duchenne, progéria, Bcl-X.

La 3<sup>ème</sup> génération d'ASO concerne des chimies plus complexes et regroupe les PNA, les PMO et les LNA. Ces ON modifiés n'activent pas non plus la RNase H.

◆ Les PNA sont capables de former des complexes stables avec les brins d'ADN ou d'ARN complémentaires avec une grande affinité, résultant de la neutralité et de la flexibilité de son squelette artificiel. Ils possèdent une résistance élevée à la dégradation enzymatique dans les environnements biologiques (Egholm *et al.* 1993). Les qualités du PNA l'ont mené à être très utilisé dans des stratégies antisens ; cependant cet ON pénètre peu dans les cellules spontanément (pour revue Chiarantini *et al.* 2005) et nécessitent un vecteur.

◆ Utilisés pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1997 dans une approche antisens (Summerton *et al.* 1997), les PMO injectés seuls ont déjà montré leur potentiel *in vivo* chez plusieurs modèles animaux (Ekker *et al.* 2001, McCaffrey *et al.* 2003). Ils ne sont pas sensibles à la dégradation enzymatique (Hudziak *et al.* 1996). A hautes doses, les PMO induiraient des effets secondaires inattendus comme la mort cellulaire (Braat *et al.* 2001, Lele *et al.* 2001). Ils se sont avérés efficaces et certains sont en essai clinique (Amantana *et al.* 2005, Arora *et al.* 2004) : maladie de West Nile en phase I, cancer de la prostate en phase I (Iversen *et al.* 2003).

◆ Les LNA (Locked Nucleic Acids) ont été décrits pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1998 (Singh *et al.* 1998). Les LNA ont une forte affinité pour l'ARN due à leur structure contrainte. Ils ont montré une efficacité *in vitro* et *in vivo* chez la souris, injectés sans vecteurs par voie intra-péritonéale. Le squelette des LNA est à l'origine d'une biodistribution séquence- et organe-spécifique et sans toxicité observée au niveau du foie (Roberts *et al.* 2006).

Plusieurs études ont montré qu'une fois dans le cytosol, les ON libres ont tendance à s'accumuler dans le noyau (Leonetti *et al.* 1991, Shoeman *et al.* 1997, Chin *et al.* 1990, Thierry *et al.* 1992). Les ON-PS, plus résistants aux nucléases, arrivent en général intacts dans le noyau alors que les ON phosphodiester ont été dégradés.

#### d. Essais cliniques.

A ce jour, on dénombre 37 essais cliniques concernant la stratégie antisens : 8 terminés, 21 en cours et 8 en recrutement. Quelques essais intéressants sont regroupés ci-après (voir Tableau 1). Ces essais concernent très majoritairement le traitement des cancers (81%), mais aussi les infections virales, les maladies auto-immunes et l'asthme allergique.

#### ***Tableau 1 : essais cliniques des ASO.***

*Données issues de l'U.S. National Institutes of Health (<http://clinicaltrials.gov/ct/gui>) et d'après Chan *et al.* 2006.*

MOLECULE	ON	PHASE CLINIQUE	NOMBRE PATIENTS	PATHOLOGIE	ANNEE	INVESTIGATEUR
Genasense (Bcl-2)	PS	I/II	49	Leucémies	2001-2003	Genta
Alicaforsen ISIS 2302 (ICAM-1)	PS	III (en cours)	150	Maladie de Crohn	2002- .....	ISIS Pharmaceu ticals
ISIS 104838 (TNF- $\alpha$ )	2'O- Me	II (en cours)	160	Arthrite rhumatoïde	2002- .....	ISIS Pharmaceu ticals
OGX-011 (clustérine)	2'O- Me	I	30	Divers cancers	2003- .....	National Cancer Institute of Canada
LErafAON (c- raf / liposome)	PS	I (en cours)	40	Cancers (tumeurs solides)	2004- .....	Neopharm
ASM8	PS	I et II (en cours)	15	Asthme	2005- .....	Topigen Pharmaceu ticals

ISIS 113715 (inhibiteur de tyrosine phosphatase)	MOE	I (en cours)	10	Diabète de type 2	2006- .....	ISIS Pharmaceuti- cals
Genasense (Bcl-2)	PS	III (en cours)	750	Mélanome	2007- .....	Genta
EZN-2968	LNA	I (en recrutement)	40	Cancer, lymphome	2007	Enzon Pharmaceuti- cals
AVI-4658	PMO	I et II (en recrutement)	9	Dystrophie Musculaire de Duchenne	2007	Imperial College of London

Plusieurs médicaments basés sur les ASO-PS ont été développés par ISIS Pharmaceuticals : Alicaforsen, Affinitak, GeneSense, ISIS 2105 / 2503 / 5132 / 14803, Vitravene<sup>TM</sup> (Crooke 2004). Des études sur 5 de ces molécules ont montré que les ASO n'étaient pas mutagènes aux concentrations testées (Crooke *et al.* 1994). En effet, un mécanisme de génotoxicité possible serait que les ASO s'intègrent dans le génome et induisent des mutations, même si cet évènement est rare, à l'instar des rétrovirus. Ces études ont montré que les ASO-PS sont en général de mauvais substrats pour les ADN polymérases et les enzymes comme les intégrases, les gyrases et les topoisomérases. Un autre mécanisme de génotoxicité serait que les ASO soient dégradés en métabolites toxiques ou carcinogènes. Les mêmes études ont montré que les ON-PS dégradés étaient à l'origine de bases normales et que l'oxydation du squelette était non toxique donc à priori non mutagène. Enfin, ces ASO n'activeraient pas le complément (Crooke 2004).

### 3) La stratégie interférence.

L'ARN interférence ou ARNi est un mécanisme phylogénétiquement conservé qui met en jeu des molécules d'ARN double-brin, qui vont activer la machinerie de l'épissage. Les ARN interférents seraient impliqués dans divers processus chez les mammifères, comme la régulation de tous les ARNm, la défense contre les virus et la méthylation de l'ADN (pour revue Scholzova *et al.* 2007).

L'ARNi a été décrite pour la 1<sup>ère</sup> fois au début des années 90, avec l'auto-extinction d'un gène introduit chez la plante (Napoli *et al.* 1990, van der Krol *et al.* 1990). Plus tard, des travaux chez la drosophile et le nématode ont établi le principe de ARNi comme un mécanisme d'extinction de gène, avec un potentiel sans précédents (Fire *et al.* 1998). Depuis,

notre compréhension de l'ARNi n'a cessé d'augmenter et a permis d'envisager le développement de nouvelles thérapies (Mello *et al.* 2004).

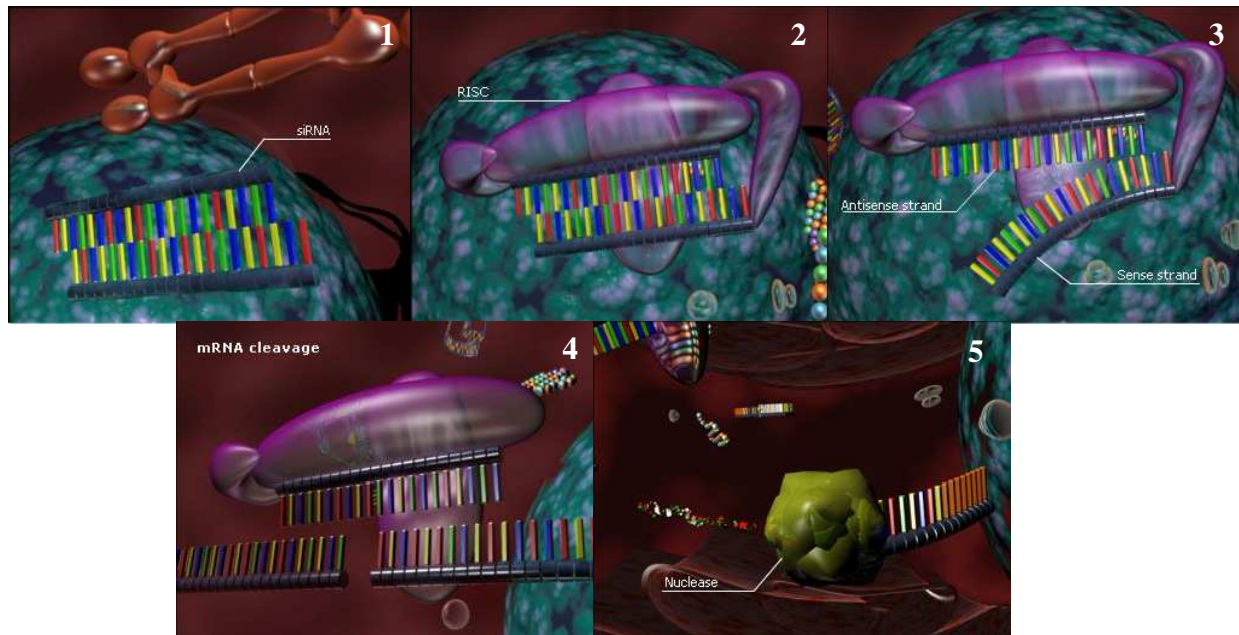
L'ARNi est initiée par le clivage de duplexes d'ARN en de petits fragments (21 à 23 nucléotides de long) nommés siRNA (small interfering RNA) par l'intermédiaire d'une enzyme appelé DICER, une RNase de type III de 220 kDa (Bernstein *et al.* 2001). Cette enzyme agit comme un dimère et clive les 2 brins de l'ARN double-brin, laissant des bouts sortant aux 2 extrémités 3'. Les ARN double-brin et les siRNA ainsi générés, trop petits, n'activeraient pas la voie des interférons (Elbashir *et al.* 2001, Kumar *et al.* 1998).

*a. Les siRNA.*

Les petits ARN interférents ou siRNA (small interfering RNA) sont donc des molécules d'ARN en double brin de 21 à 23 nucléotides, qui ont la capacité de reconnaître de façon séquence spécifique un ARNm cible et de le dégrader. Un nombre croissant d'études suggère que les siRNA sont un outil rapide, simple et efficace pour l'étude de la fonction d'un gène. De plus, les siRNA sont très prometteurs en tant que principes actifs thérapeutiques afin de supprimer l'expression de gènes spécifiques (voir Figure 5).

Une fois dans la cellule (1), le duplexe de siRNA est incorporé dans un complexe protéique (2) appelé RISC (RNA-Induced Silencing Complex) et l'activité de l'ARN-hélicase énergie-dépendante présente dans le complexe, déroule l'ARN double-brin pour libérer le brin antisens du duplexe (3). Le brin antisens guide le complexe RISC à l'ARNm homologue cible qui est alors clivé (4) par l'activité d'une endoribonucléase associée au complexe RISC, réduisant ainsi au silence le gène correspondant. Enfin, les nucléases dégradent les ARN simple brin (5) et le complexe RISC est recyclé.

**Figure 5 : étapes de l'ARN interférence menant à l'extinction d'un gène ciblé.**  
D'après Nature Reviews (<http://www.nature.com/focus/rnai/index.html>).



L'efficacité de cette stratégie *in vitro* dans les cellules de mammifères a été démontrée pour la 1<sup>ère</sup> fois en 2001 (Elbashir *et al.* 2001). Le potentiel thérapeutique de l'ARNi n'a été démontré qu'en 2002, lorsque l'extinction du gène responsable d'une grave maladie neurodégénérative a été un succès chez la souris (Lewis *et al.* 2002). Cette année-là, la revue Science a même qualifié les siRNA de « molécule de l'année » (Couzin 2002).

Tout comme les ASO, des siRNA modifiés chimiquement ont été proposés, au niveau des terminaisons 5' et / ou 3', ainsi qu'au niveau des riboses en position 2' (pour revue Dorsett *et al.* 2004). Une des modifications très utilisées est la bis(2-acétoxyéthoxy)méthyl ou 2'-ACE (Vermeulen *et al.* 2005, Hamada *et al.* 2002, Khvorova *et al.* 2003). Dans ces ON, les 5'- et 2'-hydroxyl, ainsi que les groupes amines protecteurs utilisés dans des chimies 5'-silyl-2'-orthoester ont été affinés et optimisés (Scaringe 2000). Des siRNA liés à du cholestérol ont aussi été testés (Soutschek *et al.* 2004).

Un des plus importants défis de cette approche est d'identifier la séquence qui inhibera le plus le gène en question et à la plus faible concentration possible (Scherer *et al.* 2004). Statistiquement, 1 séquence sur 5 a été démontrée efficace. Plusieurs algorithmes ont été proposés pour aider à la sélection des siRNA les plus efficaces pour une cible donnée. Ceux-ci prennent en compte plusieurs facteurs : pourcentage de GC, stabilité

thermodynamique, répétitions internes et d'autres (Dallas *et al.* 2006, Reynolds *et al.* 2004). Certains fournisseurs proposent même de tester 5 séquences différentes de siRNA et de déterminer la plus efficace (Ambion).

Des études *in vivo* chez la souris démontrent qu'il est possible d'utiliser ces molécules comme outil thérapeutique, mais le passage à l'homme pose encore de nombreuses difficultés. En effet, l'utilisation des siRNA *in vitro* et *in vivo* présente plusieurs limitations dont les plus importantes sont certainement le faible taux de pénétration dans les cellules et les tissus, ainsi que la biodisponibilité (Li *et al.* 1998, Lima *et al.* 2004). Les avantages de cette stratégie sont que les siRNA peuvent être produits rapidement et en grande quantité, et qu'ils sont efficaces dans l'extinction de gène même à faible concentration (Huber *et al.* 2006). Plusieurs techniques pour faire pénétrer les siRNA *in vivo* ont été validées : électroporation, injections locales et systémiques (pour revue Dorsett *et al.* 2004).

De nombreuses études ont montré que des siRNA injectés seuls, par mécanisme hydrodynamique c'est-à-dire par haute pression veineuse, chez la souris provoquaient une extinction de gène cible de 90% dans le foie et un peu moins dans les poumons, les reins, la rate et le pancréas (Sorensen *et al.* 2003, McCaffrey *et al.* 2002, Lewis *et al.* 2002, Giladi *et al.* 2003, Zender *et al.* 2003, Song *et al.* 2003, McCaffrey *et al.* 2003). Cependant, sans recours à cette technique brutale servant de preuve de concept (Lewis *et al.* 2007), les siRNA injectés seuls paraissent séquestrés dans les endosomes (Lingor *et al.* 2004) et doivent donc être vectorisés, avec des lipides cationiques par exemple, de loin les plus utilisés et efficaces comme vecteurs de siRNA *in vitro* et *in vivo* (Sorensen *et al.* 2003, Bitko *et al.* 2005, Landen *et al.* 2005, Nogawa *et al.* 2005, Sioud *et al.* 2003, 2004, Yano *et al.* 2004, Soutschek *et al.* 2004, McManus *et al.* 2002, Behlke 2006, Spagnou *et al.* 2004, Tagami *et al.* 2007, Morrissey *et al.* 2005, Khoury *et al.* 2006).

Le mécanisme d'action de ces molécules est encore très peu connu et une meilleure compréhension de ces mécanismes d'action nous aidera à mieux cibler les gènes que l'on veut réprimer et à développer des séquences encore plus spécifiques. En effet, les siRNA présentent eux aussi, comme les autres stratégies d'acides nucléiques qui les ont précédés (ADN et ARN antisens, ribozymes), des effets non spécifiques séquence-dépendants, dont l'inhibition de protéines non ciblées et l'induction d'une réponse inflammatoire par activation des récepteurs Toll-like (TLR) (pour revue Dorsett *et al.* 2004). La possibilité de délivrer les

siRNA uniquement dans les tissus malades est sans aucun doute un domaine de recherche en expansion et déterminant pour l'avenir thérapeutique de cette nouvelle technologie. Même si elle ne peut pas être utilisée directement comme un médicament, l'ARN interférence est déjà identifiée comme étant l'outil idéal pour comprendre la fonction des gènes (Dorsett *et al.* 2004), par exemple pour élucider le rôle de certains gènes dans le développement post-natal chez la souris (Lewis *et al.* 2002).

Une alternative du siRNA est l'utilisation de plasmides qui codent les siRNA en hairpin dits « en épingle à cheveux », en référence à sa structure secondaire : c'est la stratégie shRNA. L'ARN hairpin transcrit dans la cellule est pris en charge par DICER et génère un siRNA fonctionnel qui sera incorporé dans le complexe RISC (Wacheck *et al.* 2006). La transfection avec les plasmides est avantageuse puisqu'elle produit de nombreuses copies de shRNA et donc de molécules de siRNA endogènes. Il en résulte un effet plus prononcé de l'ARNi et plus long dans le temps, en comparaison avec la transfection de siRNA synthétisée chimiquement (McCaffrey *et al.* 2002).

Le plus gros inconvénient de la stratégie ARNi est qu'elle ne peut pas s'appliquer à toutes les cibles. En effet, par exemple inhiber une protéine intervenant au sein d'un complexe protéique pourrait dissocier le complexe et induire un « effet domino ». Celui-ci pourrait passer inaperçu si l'activité de la protéine est inhibée mais si le complexe reste intact. Dans certains cas, d'autres inhibiteurs agissant au niveau de la protéine, comme les aptamères ou les anticorps, pourraient représenter de meilleurs modèles (Thompson 2002).

Plusieurs molécules de siRNA font actuellement l'objet d'essais cliniques (voir Tableau 2). Ces essais concernent principalement les maladies oculaires, où le problème de biodisponibilité se pose de manière moins aiguë. Les siRNA sont en général injectés par voie systémique, tout comme les ON dans les stratégies antisens et les ribozymes.

**Tableau 2 : essais cliniques des siRNA.**

Données issues de l'U.S. National Institutes of Health (<http://clinicaltrials.gov/ct/gui>) et Journal of Gene Medicine ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical/](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/)).  
NR : non renseigné. AMD : Dégénérescence Maculaire liée à l'Age.

MOLECULE	PHASE CLINIQUE	NOMBRE PATIENTS	PATHOLOGIE	ANNEE	INVESTIGATEUR
Sirna-027	I	26	AMD	2004-2007	Sirna Therapeutics
IL-10	NR (en recrutement)	100	Pré-éclampsie	2004-.....	National Taiwan University Hospital
Sirna-027	I (en cours)	NR	AMD	2004-.....	Merck, Allergan, Sirna Therapeutics
Cand5 (anti-VEGF)	II et III (en cours)	120	Dégénérescence maculaire	2005-.....	Acuity Pharmaceuticals
Lentivirus / siRNA	I (en cours)	NR	HIV	2005-.....	City of Hope Medical Center Duarte
ALN-RSV01	I	NR	Maladie infectieuse respiratoire	2005-NR	Anylam Pharmaceuticas
Cand5 (anti-VEGF)	II	46	Oedème maculaire diabétique	2006-2007	Acuity Pharmaceuticals
shRNA	I (en cours)	NR	Hépatite B	2006-.....	University of California, Medical Center of San Francisco
AGN211745	II (en recrutement)	135	AMD	2007	Allergan
SV40 / siRNA	NR (en recrutement)	25	Leucémies	2007	Hadassah Medical Organization

#### b. Les miRNA.

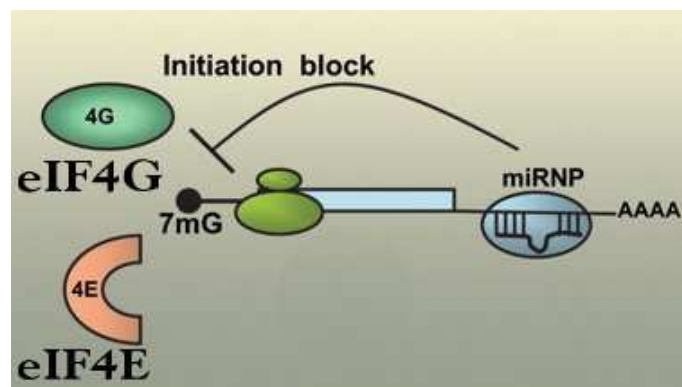
Les microRNA (miRNA) sont des oligoribonucléotides simple-brin d'environ 20 bases de long, codés par les génomes des animaux et des plantes. Ces petits ARN très conservés régulent l'expression des gènes en réprimant leur traduction (Hutvagner *et al.* 2002). Il y aurait 200 à 250 miRNA codés par le génome humain, correspondant à environ 1% des gènes, qui réguleraient potentiellement l'expression d'environ 10% des gènes codant pour des protéines (pour revue Scholzova *et al.* 2007).



Chez les mammifères, les miRNA sont encodés dans le génome par des précurseurs ARN hairpin, formant des boucles dans leur structure secondaire, qui sont transcrits principalement par des ADN polymérase de type II. Ces endonucléases nucléaires, appelées Drosha, coupent les boucles des précurseurs pour libérer des pré-miRNA d'environ 70 nucléotides. Ceux-ci sont ensuite transportés du noyau vers le cytoplasme par un mécanisme impliquant des exportines. Les DICER les clivent en des fragments de 20 à 22 nucléotides, les rendant ainsi matures (Dorsett *et al.* 2004).

Le mécanisme de répression (voir Figure 6) fait alors intervenir la fixation d'un complexe micro-ribonucléoprotéique (miRNP), qui inclut au moins 2 membres du RISC, par hybridation imparfaite du miRNA mature sur les régions 3' non codantes (UTR) d'ARNm spécifiques. Le complexe miRNP interfère avec la fonction du facteur d'initiation de la transcription (eIF4G) sur la structure de la coiffe  $7_mGMP$  en 5' de l'ARNm (Pillai *et al.* 2005, Humphreys *et al.* 2005), mais l'extrémité 3' poly-adenylée de l'ARNm joue elle aussi un rôle dans le mécanisme de répression. Ainsi, s'il y a une parfaite complémentarité entre le miRNA et l'ARNm cible, la molécule de miRNA agit comme un siRNA et sera à l'origine de la dégradation de l'ARNm spécifique (Dorsett *et al.* 2004).

**Figure 6** : *mécanisme d'action des miRNA. D'après Pillai et al. 2005.*



La 1<sup>ère</sup> description de miRNA date de 1993 (Lee *et al.* 1993), mais l'importance générale et la diversité de cette classe de petites molécules régulatrices ne sont apparues que dans les 5 dernières années. De grands efforts sont actuellement entrepris pour comprendre comment, quand, et où les miRNA sont produits et fonctionnent dans les cellules, les tissus et les organismes. Chaque miRNA régulerait l'expression de plusieurs gènes, et comme l'on prédit l'existence de centaines de miRNA chez les eucaryotes supérieurs (Lim *et al.* 2003), le réseau de régulation potentiellement offert par les miRNA est énorme.

Plusieurs groupes ont démontré que les miRNA peuvent être des régulateurs clés dans des processus aussi divers que les étapes précoces de l'embryogenèse (Reinhart *et al.* 2000), la prolifération et la mort cellulaire (Brennecke *et al.* 2003), l'apoptose et le métabolisme des lipides (Xu *et al.* 2003), la différenciation cellulaire (Dostie *et al.* 2003, Chen 2004). Les miRNA ont été impliqués dans le développement cérébral (Krichevsky *et al.* 2003), la leucémie myéloïde chronique (Calin *et al.* 2004), le cancer du colon (Michael *et al.* 2003), le lymphome de Burkitt (Metzler *et al.* 2004) et l'infection virale (Pfeffer *et al.* 2004), suggérant des liens possibles entre les miRNA et les maladies virales, le cancer et le neuro-développement.

Certains auteurs considèrent que chez les eucaryotes supérieurs, le mode de régulation de l'expression des gènes par les miRNA pourrait être d'une importance aussi grande que la régulation exercée par les facteurs transcriptionnels (Filipowicz *et al.* 2005). Etant donné l'importance de ce mode de régulation, les perspectives biomédicales ouvertes par ce nouveau champ de connaissance sont nombreuses (Weiler *et al.* 2006). Cependant, les miRNA ne font l'objet d'aucun essai clinique à ce jour.

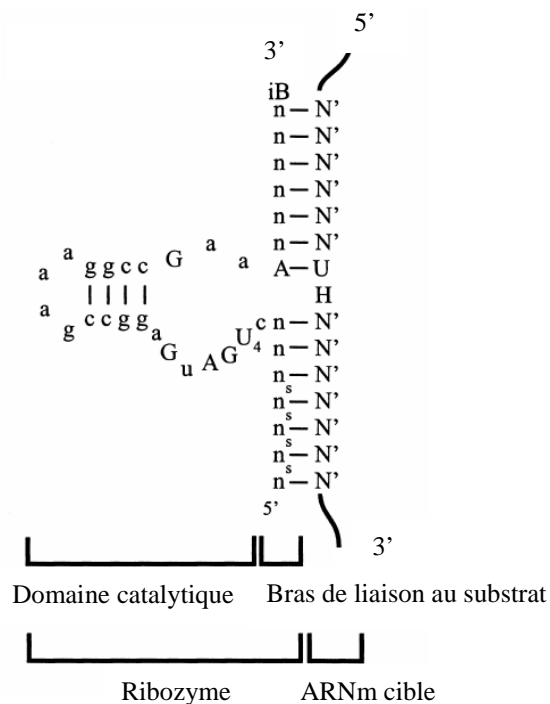
#### 4) Les ribozymes.

Découverts au début des années 1980 par Thomas R. Cech et Sydney Altman (Cech *et al.* 1981, Guerrier-Takada *et al.* 1984), les ribozymes sont des enzymes particulières. Leur centre catalytique est entièrement constitué d'ARN et ne requiert pas de protéines pour la catalyse. Bien que la plupart des ribozymes soient rares dans la cellule, leurs rôles sont essentiels. Par exemple, l'activité de catalyse de la liaison peptidique du ribosome qui traduit l'ARN en protéines, est fondamentalement un ribozyme.

De nombreux ribozymes naturels catalysent leur propre clivage, le clivage ou la ligation d'autres ARN par trans-estérification ou hydrolyse des groupements phosphate chez les eucaryotes inférieurs, les bactéries et les virus (Doherty *et al.* 2000). Ils se lient ainsi au substrat ARN par liaison de type Watson-Crick, ce qui permet le clivage séquence-spécifique de la cible ARN. Certains ribozymes sont des métalloprotéines et nécessitent des ions  $Mg^{2+}$  ou d'autres ions métalliques divalents (par exemple  $Ca^{2+}$ ) pour la liaison et la catalyse.

Il existe de nombreux groupes de ribozymes, qui présentent une grande variété de structures chimiques et de réactions métaboliques associées, mais le mécanisme de catalyse de type acide-base semble conservé (Scott 2007, Chen *et al.* 2007). Par exemple, le ribozyme de type Hammerhead (tête de marteau) comporte moins de 40 nucléotides et consiste en 2 bras de liaison au substrat et un domaine catalytique (voir Figure 7) ; c'est un ribozyme résistant aux nucléases (Usman *et al.* 2000).

**Figure 7 : structure secondaire d'un ribozyme Hammerhead. D'après Kurreck 2003.**



Ces ribozymes sont potentiellement applicables à la thérapie génique et moléculaire, pour éteindre l'expression de gènes. Leur avantage consiste en leur grande spécificité pour l'ARNm et ils ne seraient pas à l'origine de réponse immunitaire (Shiota *et al.* 2004). Ce sont des bons candidats pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Des stratégies impliquant les ribozymes contre certains virus (HIV, virus de l'hépatite) et des maladies cellulaires (cancer, diabète, arthrite rhumatoïde) pour lesquelles la thérapie conventionnelle est peu efficace, ont été proposées (Puerta-Fernandez *et al.* 2003). En 2002, Aigner et collaborateurs (Aigner *et al.* 2002) ont montré un effet très significatif de la diminution de la taille des tumeurs par les ribozymes, en ciblant le facteur de croissance FGF-2 *in vitro* et *in vivo*. Des cellules du cancer de la prostate PC-3 ont ainsi été injectées chez des souris Nude

par voie sous-cutanée et au bout de 120 jours, aucun développement de la tumeur n'avait été palpable.

**Tableau 3 : essais cliniques des ribozymes.**

Données issues de l'U.S. National Institutes of Health (<http://clinicaltrials.gov/ct/gui>).

MOLECULE	PHASE CLINIQUE	NOMBRE PATIENTS	PATHOLOGIE	ANNEE	INVESTIGATEUR
Anti-HIV	II	5	Lymphome non Hodgkin (SIDA)	1999	Rybozyme
Anti-FLT-1 (anti-cytokine)	II	40	Cancer métastatique rénal	2001	Jonsson Comprehensive Cancer Center, National Cancer Institute
Anti-HIV-1 (OZ1)	II (en cours)	74	SIDA	2002- .....	Johnson & Johnson Pharmaceutical, Tibotec Pharmaceutical Limited

Ces résultats montrent des pistes encourageantes pour l'application de nouvelles thérapies (voir Tableau 3), mais les ribozymes se sont avérés sans doute moins efficaces en comparaison avec les nouvelles stratégies interférence que constituent les siRNA et les miRNA.

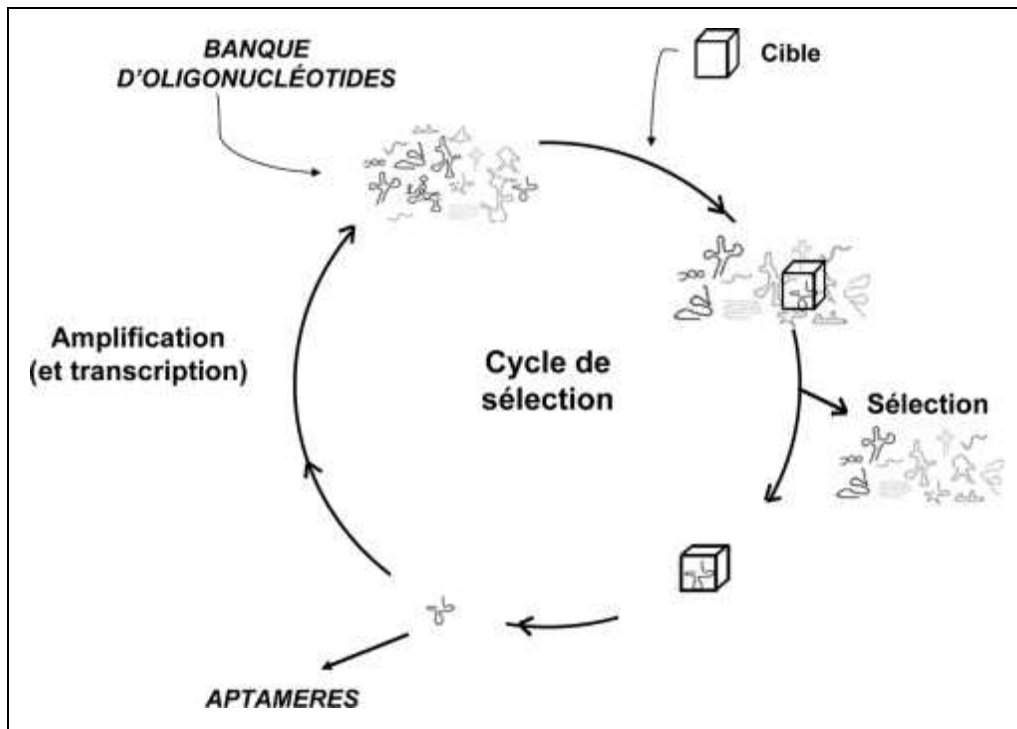
##### 5) Les aptamères.

Les aptamères sont typiquement des acides nucléiques (AN) simple-brin, entre 30 à 70 nucléotides. Ils peuvent être composés d'ADN, d'ARN ou de nucléotides modifiés chimiquement (2'-fluoro, 2'-amino, 2'-O-méthyl ou phosphorothioate) (Chan *et al.* 2006). De par leurs structures 3D, les aptamères sont capables de se lier avec une haute spécificité et affinité à une large variété de molécules, dont les protéines. Les liaisons sont de type Van der Waals, hydrogènes et électrostatiques (Pendergrast *et al.* 2005). Un nombre croissant d'aptamères est décrit (Brody *et al.* 2000, Jayasena 1999, Famulok *et al.* 2001, Sullenger *et al.* 2002).

La façon la plus efficace de sélectionner des aptamères de haute affinité pour une cible donnée est la technologie d'Evolution Systématique des Ligands par Enrichissement Exponentielle, dite SELEX (voir Figure 8), mise au point en 1990. A partir d'un mélange

d'ON ( $10^{13}$  à  $10^{15}$  séquences différentes), les ON sont sélectionnés en discriminant ON liés et non liés. Après plusieurs lavages, les ON liés sont élués de leurs cibles, amplifiés et utilisés dans le cycle de sélection suivant. Après 5 à 15 phases d'amplification, des aptamères de haute affinité sont généralement isolés. Aujourd'hui, cette technique est robotisée pour plus d'efficacité (Rimmelle *et al.* 2003, Chauveau *et al.* 2006).

**Figure 8 : principe général de la méthode SELEX. D'après Chauveau *et al.* 2006.**



Les applications des aptamères sont multiples : étude des interactions AN / protéines ou des activités catalytiques des AN, purification, détection (utilisant la PCR et détection optique, développement des puces à aptamères, imagerie moléculaire *in vivo*), régulation (contrôle de l'expression génique, inhibition de l'activité protéique). Les aptamères sont aussi utilisés comme agents thérapeutiques pour identifier certaines fonctions biologiques régulatrices ou encore pour identifier les mécanismes moléculaires de maladies, en ciblant certaines molécules virales intracellulaires ou des facteurs impliqués dans les maladies auto-immunes et inflammatoires (anticorps, interleukines). Contrairement aux stratégies antisens et interférence, les aptamères sont capables de reconnaître des marqueurs extracellulaires, pour lesquels le passage de l'expérimentation *in vitro* à des applications thérapeutiques *in vivo* est plus facile que pour des cibles intracellulaires (Chauveau *et al.* 2006). Leur manque d'immunogénicité fait à priori des aptamères de bons candidats pour des

approches thérapeutiques contre les maladies auto-immunes (White *et al.* 2000, Kim *et al.* 2003, Drolet *et al.* 2000, Rhodes *et al.* 2000). Ils ont également été utilisés pour caractériser les voies d'interaction au niveau biochimique, dans des systèmes de cellules en culture et même dans des organismes pluricellulaires (Rimmelle *et al.* 2003).

**Tableau 4 : essais cliniques des aptamères.**

Données issues de l'U.S. National Institutes of Health (<http://clinicaltrials.gov/ct/gui>).

AMD : Dégénérescence Maculaire liée à l'Age.

MOLECULE	PHASE CLINIQUE	NOMBRE PATIENTS	PATHOLOGIE	ANNEE	INVESTIGATEUR
Anti-VEGF	II et III	540	AMD	2001-2002	Eyetech Pharmaceuticals
Pegaptanib sodium	II et III	540	AMD	2001-2007	Eyetech Pharmaceuticals, Pfizer
Pegaptanib sodium (Macugen)	II	176	Œdème maculaire diabétique	2002-2005	Eyetech Pharmaceuticals
Pegaptanib sodium (Macugen)	II et III	125	AMD	2002-2006	Eyetech Pharmaceuticals, Pfizer
Anti-VEGF pégylé (EYE001)	I	5	Von Hippel-Lindau	2003-2005	National Eye Institute
Anti-facteur IXa (REG1)	I	106	Maladies cardiaques	2005	National Heart, Lung and Blood Institute
Pegaptanib sodium	IV	262	AMD	2006	Eyetech Pharmaceuticals, Pfizer

Plusieurs dizaines d'aptamères à visée thérapeutique sont actuellement en développement contre diverses pathologies (cancer, inflammation, maladies auto-immunes), avec des propriétés anti-coagulantes, anti-angiogéniques et anti-tumorales, anti-virales et anti-infectieuses, anti-prolifératives, anti-inflammatoires et modulatrices du système immunitaire (Que-Gewirth *et al.* 2007). Ils ont déjà montré des effets positifs sur les animaux (Pestourie *et al.* 2005). Certains sont en essai clinique (voir Tableau) et un aptamère dirigé contre le facteur de croissance VEGF a obtenu l'approbation de la « Food and Drug Administration » aux Etats-Unis pour traiter la Dégénérescence Maculaire liée à l'Age ([www.macugen.com](http://www.macugen.com)).

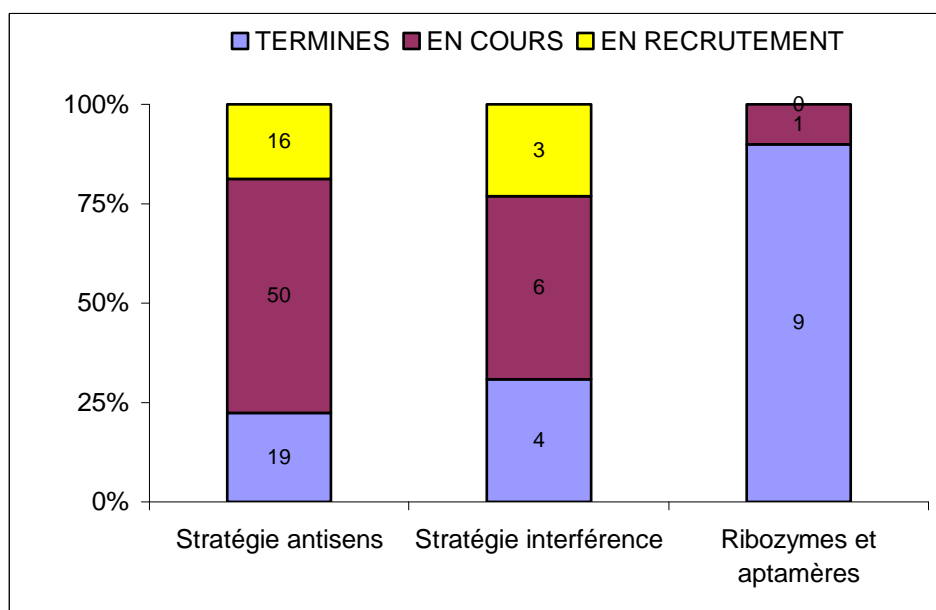
## II. A LA RECHERCHE D'UNE ADMINISTRATION OPTIMALE.

Le terme vecteur définit un ensemble de molécules constituant un transporteur qui permet la transmission d'un contenu particulier appelé cargo (un acide nucléique, une protéine, une biomolécule), tout en le protégeant de la dégradation et en contrôlant sa libération dans le temps et l'espace. Par extension, le terme vectorisation s'applique aux processus mis en jeu pour le transport de ces molécules (dossier sagascience du CNRS : Nanotechnologies et santé <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/accueil.htm>).

Les diverses stratégies citées précédemment représentent à ce jour, par rapport au nombre d'essais cliniques recensés en thérapie génique (voir Figure 9) : ribozymes et aptamères (0.8%), stratégie interférence (1.0%) et stratégie antisens (6.5%).

***Figure 9 : essais cliniques concernant les diverses stratégies antisens, interférence, ribozymes et aptamères.***

Données issues de l'U.S. National Institutes of Health (<http://clinicaltrials.gov/ct/gui>) et Journal of Gene Medicine ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical/](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/)).



L'engouement pour les nouvelles molécules de type antisens, ribozymes et aptamères à la fin des années 1990 et au début du siècle a laissé la place aux stratégies plus efficaces de type interférence, qui présentent cependant peu d'essais cliniques à ce jour.

La vectorisation constitue le problème principal pour l'application des stratégies antisens et interférence, ainsi que pour la thérapie génique. L'injection d'acides nucléiques nus s'est avérée peu efficace, car une fois dans l'organisme, l'AN est rapidement dégradé par les nucléases. De plus, seul il pénètre très mal dans les cellules et sa durée d'expression dans la plupart des tissus est très courte (Mountain 2000). Afin de protéger l'AN et favoriser son transfert dans la cellule, il existe à ce jour plusieurs méthodes :

- les méthodes physiques et physicochimiques
- les vecteurs viraux
- les vecteurs synthétiques.

Ces vecteurs présentent chacun des avantages et des inconvénients (voir Tableau 5).

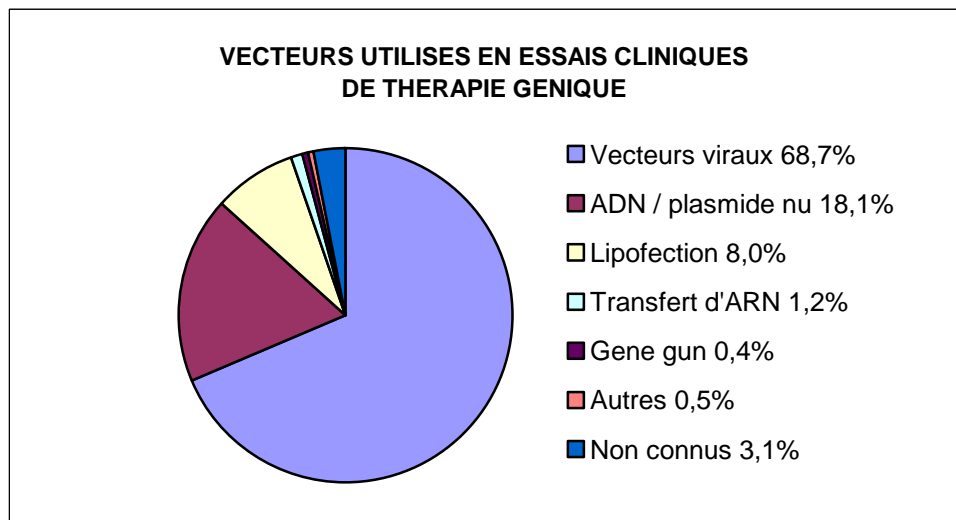
***Tableau 5 : principaux procédés utilisés pour le transfert d'AN.***

<b>METHODES</b>	<b>EXEMPLES</b>	<b>AVANTAGES</b>	<b>INCONVENIENTS</b>
<b>METHODE PHYSIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE</b>	<i>Coprécipitation</i> <i>Electroporation</i> <i>Micro-injection</i> « Gene gun »	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Efficacité <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i></li> <li>◆ Administration locale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Nombre d'applications limité <i>in vivo</i></li> </ul>
<b>VECTEURS VIRAUX</b>	<i>Rétrovirus</i> <i>Adénovirus</i> AAV	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Grande efficacité de pénétration dans la cellule</li> <li>◆ Bonne efficacité de transfection <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i></li> <li>◆ Durée d'expression longue</li> <li>◆ Stabilité dans l'expression du transgène</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Insertion aléatoire dans le génome de l'hôte pour les rétrovirus</li> <li>◆ Immunogénicité</li> <li>◆ Toxicité</li> <li>◆ Production difficile et coûteuse</li> <li>◆ Taille de l'insert limitée</li> </ul>
<b>VECTEURS SYNTHÉTIQUES</b>	<i>Lipides cationiques</i> <i>Polymères cationiques</i> <i>Peptides</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Protection de l'AN</li> <li>◆ Synthèse simple, contrôlée et en grande quantité</li> <li>◆ Efficacité de pénétration</li> <li>◆ Efficacité de transfection <i>ex vivo</i></li> <li>◆ Non/peu immunogènes</li> <li>◆ Taille de l'insert illimitée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Transfection transitoire</li> <li>◆ Cytotoxicité</li> <li>◆ Efficacité de transfection assez faible et variable selon les vecteurs</li> <li>◆ Durée d'expression génique courte</li> </ul>

Les vecteurs viraux, longtemps « à la mode », ont fait l'objet de nombreux essais cliniques à l'origine du décès de plusieurs patients (Raper *et al.* 2003), les plus connus étant ceux engagés par l'équipe d'Alain Fischer. Moins immunogènes et toxiques que les virus, les vecteurs synthétiques suscitent aujourd'hui un intérêt grandissant et de nombreuses applications (voir Figure 10).



**Figure 10** : *essais cliniques concernant les divers vecteurs utilisés en thérapie génique.*  
Données issues de *Journal of Gene Medicine* ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical/](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/)).



Aujourd'hui, le développement de vecteurs pour la délivrance d'AN est en pleine expansion : on dénombre 232 essais cliniques en thérapie génique avec de l'ADN / plasmide nu, dont 147 en cours (4 en phase II/III et III) ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical/](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/)). Ceci met en évidence le principal problème : trouver un vecteur fiable, non toxique et non immunogène, pour délivrer les AN efficacement.

### 1) Les méthodes physiques et physicochimiques.

#### a. *Coprécipitation au phosphate de calcium.*

Cette méthode consiste à mélanger de l'ADN avec du chlorure de calcium, dans un tampon phosphate, à l'origine de la formation de complexes. Cette solution permet l'endocytose de l'ADN par phagocytose, une fois mis en présence avec les cellules *in vitro*. Les premières expériences ont été réalisées dans les années 70, pour introduire de l'ADN viral (adénovirus de type V, HSV-1) *in vitro* (Graham *et al.* 1973, Stow *et al.* 1976).

#### b. *L'électroporation.*

L'administration d'un courant électrique, de courte durée et dans certaines conditions d'impulsions, augmente la perméabilité des membranes cellulaires, ce qui permet le passage de molécules *in vitro*. En effet, le champ électrique polarise les molécules de la membrane cellulaire et déstabilise transitoirement son intégrité moléculaire. Elle se dénude localement et

des pores se forment laissant fuir des composés cytoplasmiques et rentrer des composés exogènes (Neumann *et al.* 1982, Heller *et al.* 2006). Un appareil efficace d'électroporation, développé par Amaxa, est commercialisé sous le nom de Nucleofector et destiné à transférer tous types de cellules (bactéries, cellules de mammifères, etc.).

L'amélioration de cette technique a permis son utilisation pour le transfert de gène *in vivo*, avec de nombreuses applications thérapeutiques : essentiellement cancers, mais aussi régulation de protéines et vaccination. La méthode d'électroporation intramusculaire s'est avérée efficace et actuellement 2 essais cliniques sont en cours et 7 en recrutement (<http://clinicaltrials.gov/ct/gui>) pour le traitement de divers cancers (tête / cou, mélanome, cancer du pancréas).

*c. La micro-injection.*

La micro-injection directe des gènes dans les noyaux cellulaires est une autre méthode de transfection qui abroge l'exposition de l'ADN aux conditions acides des endosomes. Bien que limitée par rapport au nombre de cellules, la micro-injection est particulièrement utile pour délivrer l'ADN aux cellules embryonnaires ou aux oocytes. L'injection directe de l'ADN dans le muscle squelettique ou cardiaque est associée à l'internalisation dans des cellules et à l'expression du transgène. Des résultats semblables ont été obtenus après injection de l'ADN dans les tumeurs solides chez des souris Nude. Dans cette étude, l'expression du gène rapporteur a été stable pendant 5 jours et peut persister jusqu'à 10 jours après injection (Yang *et al.* 1995). De manière significative, l'injection intratumorale du gène de l'interféron- $\gamma$  a été associée à l'inhibition de la croissance tumorale (Sun *et al.* 1995).

*d. Le bombardement de gène ou « gene gun ».*

La peau constitue une barrière au niveau de l'accessibilité et de la visualisation pour la délivrance de gènes médicaments. Le « gene gun » accélère des particules en or ou de tungsten (environ 1 $\mu$ m de diamètre), recouvertes d'ADN (0.5 à 5 $\mu$ g par mg d'or) jusqu'aux cellules cibles ou dans les tissus. Grâce à leur petite taille, les particules peuvent pénétrer à travers la membrane cellulaire. Une fois dans la cellule, l'ADN est dissocié des particules d'or et peut être exprimé (Lin *et al.* 2000). Un système de délivrance via des particules balistiques a été mis au point par Bio-Rad et est actuellement commercialisé sous le nom de Helios, dont le but est d'introduire des gènes dans la peau.

Le « gene gun » représente 0.4% des essais cliniques en thérapie génique, avec 5 essais cliniques : un essai terminé en 2003 et les 4 autres en cours, aux stades I et II, tous pour le traitement du mélanome à base de cytokines ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical/](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/)). L'application de cette technique reste cependant très limitée, le facteur limitant étant le degré de pénétration dans les cellules de mammifères (Lin *et al.* 2000).

## 2) Les vecteurs viraux.

### a. *Les adénovirus.*

Ce sont des virus à ADN linéaire. Le génome viral n'a pas la capacité de s'intégrer dans celui de l'hôte et reste épisomal dans le noyau, tout en utilisant les machineries enzymatiques. Son expression est par conséquent transitoire et faible, ce qui n'est pas un avantage pour le traitement des maladies chroniques. Les adénovirus de 1<sup>ère</sup> génération avaient l'inconvénient d'induire de fortes réponses immunitaires, limitant leur utilisation en essai clinique. Une 2<sup>nde</sup> génération d'adénovirus « helper-dépendent », plus prometteurs, se sont avérés moins immunogènes et permettant une expression du transgène à plus long terme (Jozkowicz *et al.* 2005). D'autres méthodes proposent d'atténuer ou d'éliminer leur toxicité, ou bien de cibler les adénovirus (St George 2003).

Malgré la démonstration de leur efficacité *in vivo* sur l'animal, les adénovirus provoquent toujours des réponses inflammatoires et leur toxicité, surtout au niveau du foie, est problématique (Palmer *et al.* 2005). Un essai clinique a été à l'origine de la mort d'un patient traité avec un adénovirus de 2<sup>nde</sup> génération (Raper *et al.* 2003). Les adénovirus représentent aujourd'hui 25% des essais cliniques en thérapie génique, chiffre cependant stable depuis les années 2000.

### b. *Les rétrovirus.*

Ils ont été utilisés pour la 1<sup>ère</sup> fois dans les années 80 (Ellis *et al.* 1989, Guild *et al.* 1988). Ce sont des virus à ARN. Après internalisation nucléaire de l'ARN rétroviral, celui-ci est rétrotranscrit en ADN et est ensuite intégré dans le génome de l'hôte, d'où son intérêt comme vecteur dans le transfert de gène (Zhang *et al.* 2006). Leur insertion permet leur transmission à la descendance mais se fait de façon aléatoire, d'où la possibilité d'engendrer des mutations.

Les rétrovirus représentent 23% des essais cliniques en thérapie génique. Ils ont été les premiers vecteurs testés en essais cliniques dans les années 90, dans le cadre de la thérapie génique, qui n'ont pas donné les effets escomptés chez l'homme ; des expériences préalables chez l'animal n'avaient en effet pas été réalisées (Blaese 1995).

L'équipe d'Alain Fischer a engagé des expériences en 1999 (Fischer *et al.* 1999) sur des enfants atteints de SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) lié au chromosome X, une maladie rare à l'origine d'une grave déficience au niveau du système immunitaire des enfants, alors appelés « enfants bulles ». L'idée était d'insérer un gène vectorisé par un rétrovirus, ayant la capacité de s'insérer dans le génome humain. Le gène  $\gamma_c$ , une fois inséré, aurait été à l'origine de l'expression des récepteurs de cytokines, dont la voie de signalisation est déficiente chez les enfants atteints. Cependant, le vecteur viral s'est inséré dans un oncogène et l'a activé, ce qui a déclaré une leucémie dans un 1<sup>er</sup> temps, leur décès plus tard. Ces effets non désirés n'avaient pourtant pas été observés chez l'animal de laboratoire (Cavazzana-Calvo *et al.* 2004, Cavazzana-Calvo *et al.* 2005, Fischer *et al.* 2002).

Depuis cet épisode et celui concernant les adénovirus, la communauté scientifique se tourne plus vers les vecteurs non viraux, potentiellement moins dangereux pour la santé publique.

### 3) Les vecteurs synthétiques.

Pour permettre un système optimal de transport, un vecteur synthétique nécessite certaines caractéristiques :

- former un complexe avec l'AN à vectoriser et le compacter,
- protéger l'AN des diverses sources de dégradation comme les nucléases,
- obtenir des particules vecteur synthétique / AN homogènes et de petite taille (<500nm),
- faciliter la fixation de l'AN sur la cellule car celui-ci étant chargé négativement, il ne peut adhérer spontanément à la membrane plasmique polyanionique des cellules,
- favoriser le passage de l'AN hydrophile à travers le milieu hydrophobe constitué par la membrane plasmique et/ou endosomique,
- permettre le trafic intracellulaire et la pénétration de l'AN dans le noyau,
- transfecter efficacement *in vivo*.

En considérant le vecteur comme transporteur du principe actif, on distingue 3 grandes classes de vecteurs synthétiques, ayant leurs caractéristiques propres : les lipides, les polymères cationiques et les peptides.

*a. Les polymères cationiques.*

De la même façon que pour les liposomes, l'attraction électrostatique entre les charges cationiques des polymères et les charges négatives de l'ADN résulte en un complexe particulaire appelé polyplexe, capable de transfecter les cellules. Tous les polymères cationiques se lient et condensent très fortement les AN. Parmi les polymères naturels, on peut citer les histones (Fritz *et al.* 1996), certaines protéines chromosomiques comme HMG1 (Bottger *et al.* 1988), le chitosan (Erbacher *et al.* 1998). Les polymères les plus documentés sont regroupés dans le tableau suivant (Brown *et al.* 2001, De Smedt *et al.* 2000).

**Tableau 6 : exemples de polymères cationiques.**

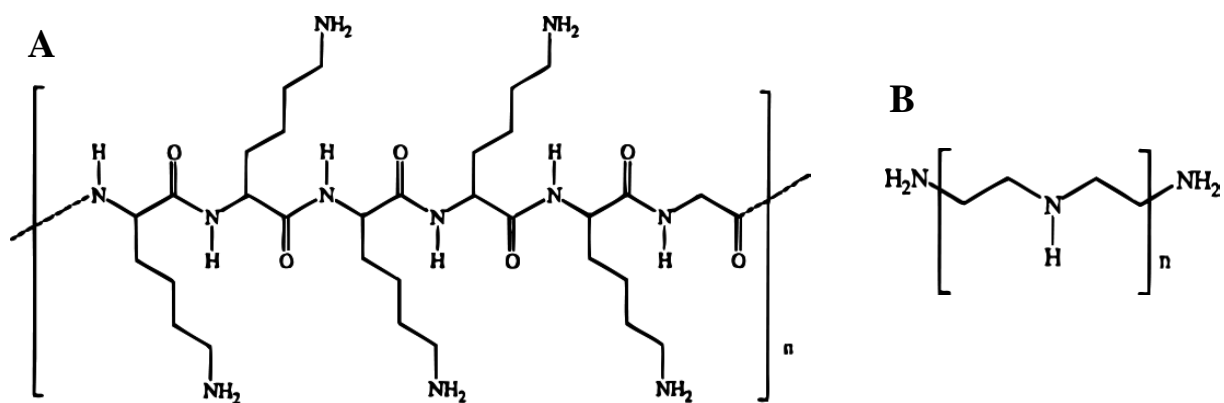
<b>POLYMERES</b>	<b>ACTION SPECIFIQUE</b>	<b>REFERENCE</b>
<b><i>Poly-L-lysine</i></b>	Fusion membranaire Nécessite l'addition d'adjuvants	Uster <i>et al.</i> 1985 Wu <i>et al.</i> 1987 Lemaître <i>et al.</i> 1987
<b><i>Diméthylaminoéthyl-dextran (DEAE-dextran)</i></b>	Non fusiogénique Nécessite l'addition d'adjuvants	Takai <i>et al.</i> 1990
<b><i>Nanoparticules</i></b>	Transfection de courts fragments d'AN Protection des AN contre les exonucléases	Chavany <i>et al.</i> 1992 Godard <i>et al.</i> 1995
<b><i>PEI branchée</i></b>	Endocytose Neutralisation des protons H <sup>+</sup>	Boussif <i>et al.</i> 1995
<b><i>PEI linéaire</i></b>	Lyse des endosomes	Ferrari <i>et al.</i> 1997 Chemin <i>et al.</i> 1998
<b><i>PAMAM</i></b>	Modification de l'acidification des compartiments endosomaux	Tang <i>et al.</i> 1996 Kukowska-Latallo <i>et al.</i> 1996
<b><i>Chitosan</i></b>	Ne nécessite pas la présence d'agents endosomolytiques Plus efficace que la PEI	Erbacher <i>et al.</i> 1998
<b><i>Poly-L-lysine histidylée</i></b>	Déstabilisation de la membrane des endosomes	Midoux <i>et al.</i> 1999

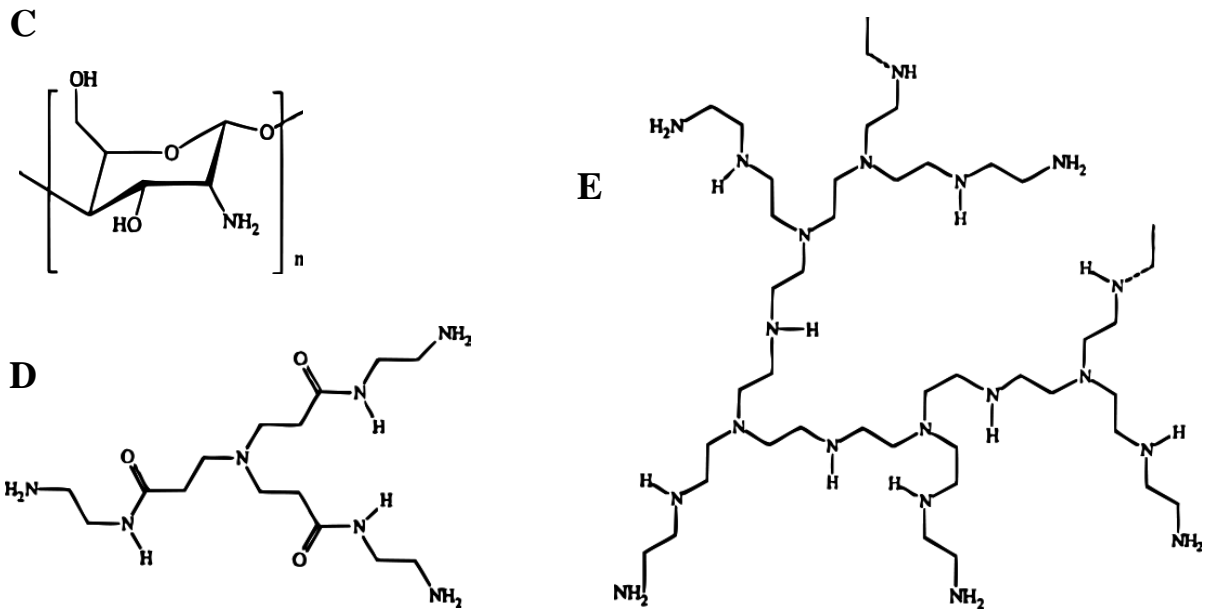
La PEI (Polyéthylènimine), polymère le plus connu, est une sphère cationique de divers degrés de polymérisation appelés dendrimères. Elle existe sous forme branchée de 25kDa, commercialisée sous le nom de jet-PEI (Polyplus-transfection, Strasbourg, France), et linéaire sous le nom d'ExGen 500 (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canada), moins toxique. Bien que très efficace *in vitro* et *in vivo*, l'excès de charges positives favorise l'interaction non

spécifique avec la membrane cellulaire. Ce polymère auto-perméabilisant est en conséquence très toxique, à cause de cet excès de charges contenu surtout dans la PEI libre (Clamme *et al.* 2003) et de la taille de la molécule. Ainsi, la diminution de sa taille à 10kDa permis de diminuer significativement sa toxicité tout en conservant son efficacité de transfection (Fischer *et al.* 1999, Godbey *et al.* 1999).

Les polyamindodendrimères (PAMAM) sont une classe de polymères synthétiques fortement branchés en forme d'étoile sphérique (Yoo *et al.* 1999). Les dendrimères dits fracturés (partiellement dégradés) ont un pouvoir de transfection 50 fois supérieur aux dendrimères intacts de 1<sup>ère</sup> génération (Tang *et al.* 1996). Ces PAMAM sont d'ailleurs commercialisés sous le nom de SuperFect (QIAGEN).

**Figure 11** : structure des principaux polymères cationiques linéaires (A-C) et branchés (D-E). A : poly-L-lysine. B : PEI linéaire. C : Chitosan. D : dendrimère PAMAM de 1<sup>ère</sup> génération. E : PEI branchée. D'après De Smedt *et al.* 2000.

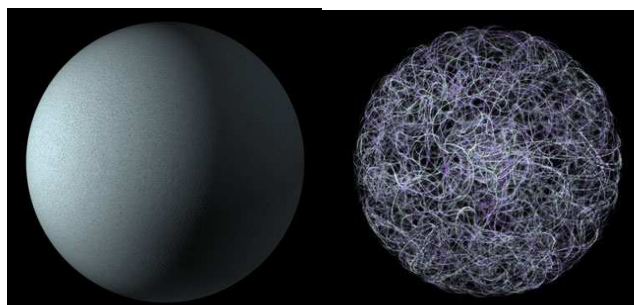




Certaines particules sont composées de polymères seulement au niveau de l'enveloppe. Une nanocapsule est constituée d'une enveloppe de polymère et d'un compartiment huileux ou aqueux contenant le médicament : c'est un système de type réservoir. Une nanosphère est un ensemble de polymères enchevêtrés pour former un réseau matriciel dans lequel la molécule d'intérêt est piégée (voir Figure 12). Certaines nanosphères réalisées à partir de l'albumine du sérum humain ont été développées pour véhiculer de l'ADN (Simoes *et al.* 2004). Les vecteurs basés sur l'utilisation de molécules naturelles (chitosan, albumine) minimisent les interactions avec les autres composants intercellulaires.

**Figure 12** : images de synthèse d'un polymère de type nanocapsule (à gauche) et de type nanosphère (à droite).

Images issues du CNRS (<http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/accueil.htm>).



A ce jour, les polymères cationiques ne font pas l'objet d'essais cliniques en tant que vecteur seul. Certains sont cependant utilisés pour améliorer l'efficacité de vectorisation de

---

biomolécules : PEG (43 essais dont 7 en recrutement), chitosan (3 essais en recrutement), PEI (1 essai en recrutement) et polylysine (1 essai en recrutement).

*b. Les peptides.*

◆ *PEPTIDES VECTEURS.*

Les CPP (Cell Penetrating Peptides) sont un groupe de peptides vecteurs naturels ou synthétiques, de 7 à 30 AA, capables de vectoriser certaines molécules d'intérêt (AN, drogues, protéines) pour assurer leur délivrance dans les cellules (Morris *et al.* 1999, 2001, Simeoni *et al.* 2003).

Le peptide le plus étudié, TAT fait partie des CPP et plus précisément de la classe des peptides riches en arginine, tout comme Antennapedia (Antp) ou la Pénétratine (Torchilin 2005, Abes *et al.* 2007). TAT est le facteur activateur de transcription issu du HIV-1 et comporte 86 acides aminés (AA). Il comprend une région riche en cystéine et une région basique impliquée dans la localisation nucléaire et nucléolaire, ainsi que dans la liaison à l'ARN. Par conséquent, TAT est chargé positivement. La protéine est encodée par 2 exons et uniquement le 1<sup>er</sup> exon codant pour 72 AA de la partie N-terminale est suffisante pour l'activité de TAT. Le peptide utilisé dans les études est en général limité aux AA 48 à 60, fragment permettant son internalisation (Vives *et al.* 1997).

Notre équipe a montré que le peptide TAT (48-60) était internalisé par la voie d'endocytose impliquant les clathrines et les protéoglycans membranaires (Abes *et al.* 2007, Richard *et al.* 2003, 2005). Cependant, en fonction des concentrations expérimentales utilisées, des mécanismes indépendants de l'endocytose semblent aussi intervenir (Simeoni *et al.* 2003).



**Tableau 7 : exemples de peptides vecteurs.**

<b>PEPTIDES</b>	<b>ORIGINE</b>	<b>SEQUENCE</b>	<b>REFERENCE</b>
<b>TAT (48-60)</b>	HIV-1	GRKKRRQRRRPPQC	Vives <i>et al.</i> 1997
<b>Pénétratine</b>	Antennapedia	RQIKIWFQNRRMKWKK	Derossi <i>et al.</i> 1994
<b>Transportan</b>	Synthétique	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Pooga <i>et al.</i> 1998
<b>MPG</b>	Synthétique	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	Morris <i>et al.</i> 1997
<b>Pep-1</b>	Synthétique	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	Morris <i>et al.</i> 2001
<b>Oligo Arginine</b>	Synthétique	(R) <sub>n</sub>	Rothbard <i>et al.</i> 2000
<b>Oligo Lysine</b>	Synthétique	(L) <sub>n</sub>	Sazani <i>et al.</i> 2001 Siwkowski <i>et al.</i> 2004

Plus récemment, de nouveaux peptides riches en arginine ont été étudiés dans des systèmes biologiques *in vitro* et *in vivo* : R<sub>6</sub>-pénétratine, (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PNA et (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PMO (Abes *et al.* 2006, Abes *et al.* 2007a, 2007b, Resina *et al.* 2007, Moulton *et al.* 2007). Ces CPP se sont avérés efficaces pour corriger un épissage alternatif défectueux ou induire un saut d'exon (voir paragraphe sur les applications), en l'absence d'agent endosomolytique. Cependant, une grande partie de ces peptides reste toujours séquestrée dans les endosomes, d'où une activité pas assez performante pour l'instant.

La séquestration dans les endosomes des peptides vecteurs est la limitation de leur utilisation *in vivo* et par conséquent de leur étude plus poussée en essai clinique.

#### ◆ PEPTIDES MICROBIENS.

Des peptides microbiens cationiques ont aussi été utilisés et plus de 500 ont été identifiés. On distingue les peptides linéaires formant des hélices, ceux riches en cystéine et ceux contenant un pourcentage élevé d'un type d'AA. Les peptides microbiens ont la capacité de perméabiliser les membranes plasmiques des cellules par un effet de type détergent et de créer des pores pour permettre leur entrée. Ce mécanisme d'action est très rapide,

concentration dépendante et indépendante de l'interaction avec une cible moléculaire unique (Andres *et al.* 2007). Ces peptides n'utilisent donc pas les voies d'endocytose pour pénétrer dans les cellules. Cependant, ils doivent en général être utilisés à très forte concentration, d'où une toxicité élevée. À ce jour, seuls quelques peptides antimicrobiens ont fait preuve d'une efficacité potentielle dans le traitement des infections systémiques. Plusieurs molécules sont en stade avancé de développement dans le cadre d'infections localisées, sous forme de topique (Andres *et al.* 2005).

#### ◆ PEPTIDES DE FUSION.

A l'instar de certaines protéines virales, d'autres types de peptides, de type fusiogène, ont été étudiés. Ils ont la particularité de déstabiliser les membranes à pH acide et sont souvent utilisés comme cofacteurs pour la transfection d'ADN ou d'ON (Plank *et al.* 1998). Ces peptides peuvent être riches en acide glutamique (Midoux *et al.* 1998, Midoux *et al.* 1993, Plank *et al.* 1994) ou en histidine (Midoux *et al.* 1998, Melino *et al.* 1999). Ces peptides utilisent les voies d'endocytose classique, via les endosomes et les lysosomes. Leur protonation dans les compartiments acides conduit à une déstabilisation des membranes, puis en un changement de conformation des peptides (Plank *et al.* 1998).

Les peptides riches en glutamate, anioniques, diffusent rapidement mais ont une efficacité réduite en présence de protéines sériques. Cependant, une fois fixés sur un vecteur, ils ont tendance à perdre leur capacité à déstabiliser les membranes (Midoux *et al.* 1995).

Dans le cas des peptides riches en histidine, chargés positivement, les groupements imidazoles se protonnent à  $5.5 \leq \text{pH} \leq 6.5$  dans les endosomes. Utilisés à forte concentration, de la même façon que les agents endosomolytiques (chloroquine, sucrose), ils sont très toxiques voire létaux pour les cellules. Leur utilisation *in vivo* paraît donc limitée.

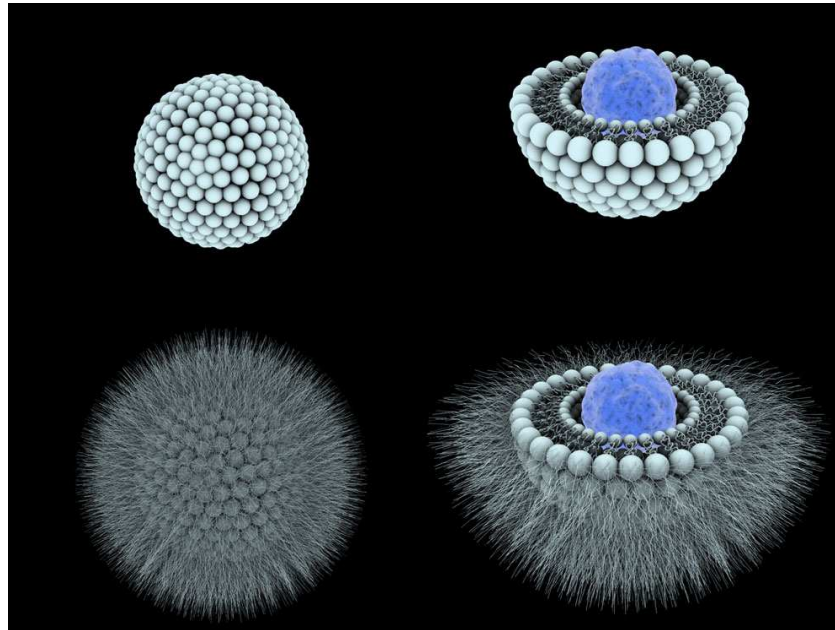
#### c. Vecteurs utilisant les lipides.

Actuellement, les liposomes sont utilisés commercialement pour la délivrance d'anticancéreux, d'agents de contraste en scintigraphie et d'adjuvants vaccinaux.

Les liposomes sont des vésicules phospholipidiques artificielles, de taille variant entre 20nm et 2 $\mu$ m, et pouvant enfermer de nombreuses molécules solubles (dans leur cœur aqueux, voir Figure 13) et insolubles dans l'eau (dans le compartiment hydrophobe de la bicouche

phospholipidique) ; ils peuvent aussi être liés à des molécules de PEG (polyéthylène glycol), greffées à leur surface. Ils sont considérés comme vecteur de médicaments les plus prometteurs depuis 2 décennies (Torchilin 2005).

**Figure 13** : images de synthèse d'un liposome (en haut) et d'un liposome pégylé (en bas).  
 En bleu : molécule d'intérêt hydrophile contenue dans le compartiment aqueux central.  
 Images issues du CNRS (<http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/accueil.htm>).



Malgré la démonstration de certains effets biologiques des ON thérapeutiques (Soriano *et al.* 1983, Thierry *et al.* 1993, Leonetti *et al.* 1990), le rendement de transfection s'est avéré un peu faible. De la sorte, les chercheurs se sont tournés vers des formulations permettant une plus grande condensation des AN (Thierry *et al.* 1992).

Dans ce contexte de délivrance, les liposomes ont reçu une attention toute particulière pour leur capacité à présenter un lipide cationique, à conduire à des particules complexant l'AN et donc le transporter : les lipoplexes (Lx). Les 1<sup>ers</sup> travaux pionniers pour la délivrance de gène utilisaient des lipides avec une tête polaire, protonée à pH physiologique (Felgner *et al.* 1987). Depuis, un nombre très important de lipides cationiques ont été synthétisés chimiquement et étudiés pour la délivrance de gène (Brown *et al.* 2001). Aujourd'hui, les liposomes occupent la 1<sup>ère</sup> place parmi les vecteurs synthétiques, avec 8% des essais cliniques en thérapie génique, de par leur rapport efficacité / toxicité. En effet, les polymères cationiques s'avèrent en général toxiques et les peptides peu efficaces.

La structure, l'historique et la diversité des lipides cationiques, puis l'entrée dans la cellule des lipoplexes qui en sont constitués, sont détaillés dans le chapitre suivant.

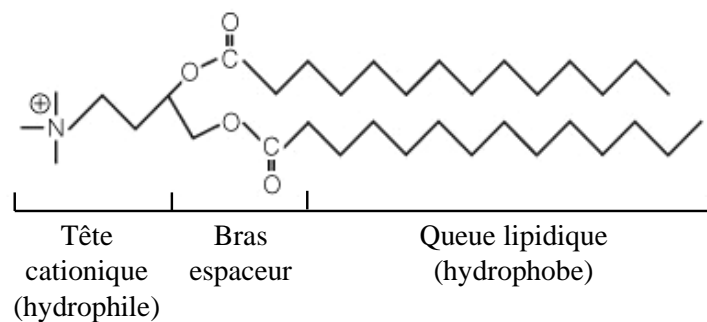
### III. LES LIPIDES COMME VECTEURS D'ACIDES NUCLEIQUES.

#### 1) Structures des lipides, des liposomes et des lipoplexes.

##### a. *Structure des lipides.*

Les lipides cationiques dans un liposome possèdent une chaîne hydrophobe. Une tête polaire conduit à un auto-assemblage en bicouches, puis à une vésicule fermée et dispersée en milieu aqueux. Ainsi, dans un milieu aqueux, la partie hydrophobe est protégée et les groupements amines sont exposés. Ces derniers permettent les interactions électrostatiques avec l'ADN et leur condensation en de petites particules complexes (voir Figure 14), grâce à la réaction de condensation des contre-ions de Manning-Oosawa.

***Figure 14 : structure générale d'un lipide cationique.***



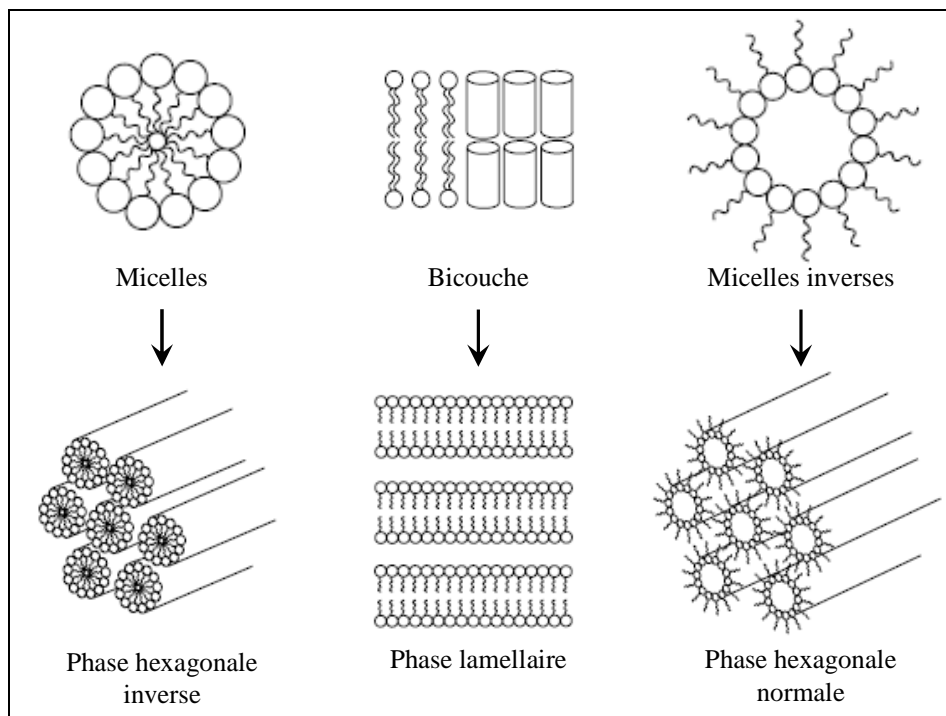
Les lipides cationiques qui rentrent dans la formulation des liposomes sont de nature chimique différente des phospholipides, mais ils partagent tous une structure commune : une tête cationique hydrophile, un espaceur, un groupement de liaison (linker) et une partie hydrophobe. La partie hydrophobe est souvent constituée par 1 ou 2 chaînes d'acide gras ou groupements alkyls de 12 à 18 atomes de carbone en longueur (C<sub>n</sub>). Les acides gras utilisés le plus fréquemment sont l'acide oléique (C18), l'acide palmitoléique (C16) ou l'acide myristylique (C14). Dans une autre famille de lipides cationiques, cette partie hydrophobe est constituée par un noyau cholestérol ou un dérivé cationique d'acide biliaire.

Les molécules lipidiques polaires (amphiphiles) peuvent s'auto-agréger et s'auto-assembler pour former diverses particules colloïdales, en fonction de la température et de la concentration ionique (pour revue Lasic 1998) : organisation en (voir Figure 15)

- micelles (savons, détergents, lysophospholipides)

- bicouches (phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, DODAC)
- micelles inverses (phosphatidyléthanolamine, CL).

**Figure 15 : organisation des lipides.** Adapté de Lasic 1998.



La symétrie de l'auto-assemblage du lipide a une influence sur les diverses phases formées. Dans les micelles, les lipides ont une forme de cône inversé et s'auto-organisent en phases isotropiques et hexagonales inverses. Dans les bicouches, les lipides ont une forme de cylindre et s'auto-organisent en phases lamellaires (cubiques). Enfin, dans les micelles inverses, les lipides ont une forme de cône et s'auto-organisent en phases hexagonales normales. Ces structures auto-organisées sont de nature cristal liquide. La formation de bicouches en présence d'un excès d'eau conduit à la formation d'une vésicule fermée appelée liposome.

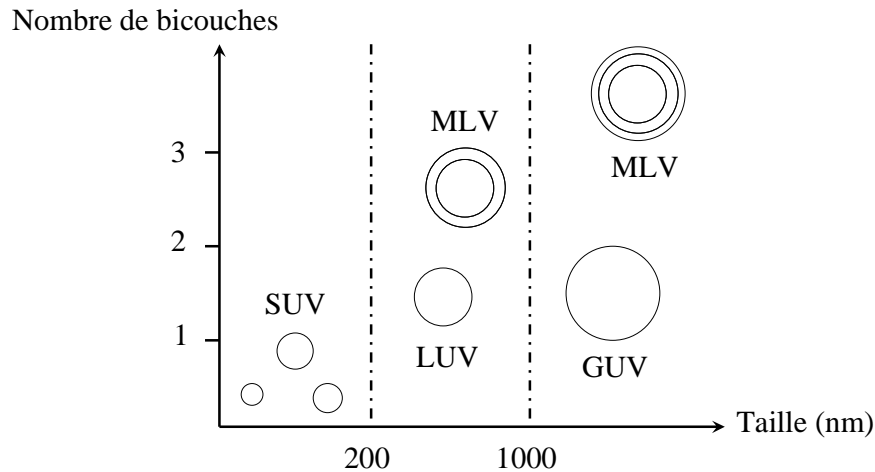
#### *b. Structure des liposomes.*

On distingue plusieurs types de liposomes selon la taille des particules et le nombre de bicouches (Lorin *et al.* 2004) :

- les SUV (Small Unilamellar Vesicles) :  $SUV \leq 200\text{nm}$  ;
- les LUV (Large Unilamellar Vesicles) :  $200\text{nm} < LUV \leq 1\mu\text{m}$  ;
- les MLV (MultiLamellar Vesicles) :  $MLV > 200\text{nm}$  ;

- les GUV (Giant Unilamellar Vesicles) :  $GUV > 1\mu\text{m}$ .

**Figure 16 : classification des liposomes.**



A hautes concentrations en lipides, toutes les méthodes d'hydratation donnent des MLV, non utilisables pour la plupart des applications, à cause de leurs tailles et du faible volume intérieur d'encapsulation de composés. Ces liposomes peuvent alors être convertis en SUV ou LUV par des méthodes mécaniques (pour revue Lasic 1998) :

- pour obtenir des SUV : sonication, extrusion
- pour obtenir des LUV : congélation / décongélation, extrusion.

Du fait du grand diamètre des LUV, l'organisation des phospholipides est identique dans chacune des monocouches (Schieren *et al.* 1978).

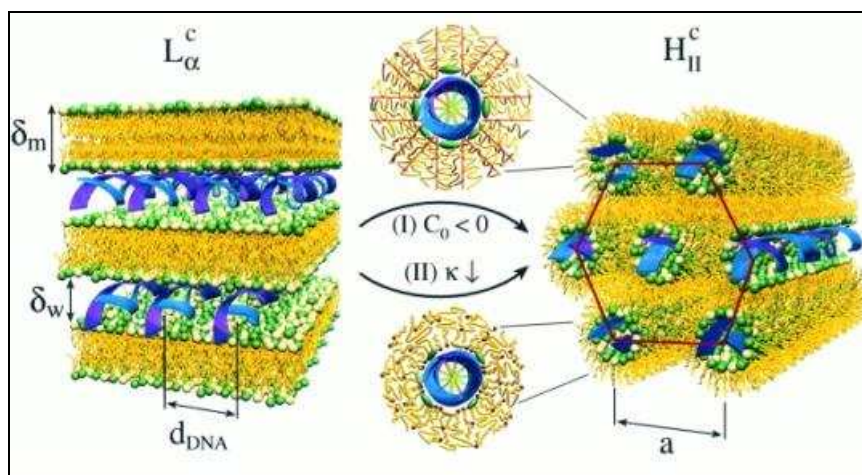
Les liposomes sont des structures fermées constituées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques organisées entre 2 compartiments aqueux (Bangham *et al.* 1965, Johnson *et al.* 1971). Leur taille varie de 20nm à plusieurs  $\mu\text{m}$ . En général, les phospholipides naturels forment spontanément des liposomes en milieu aqueux (Poznansky *et al.* 1974, Lebed *et al.* 1989). Les phospholipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent une tête polaire et une queue apolaire. En milieu aqueux, l'organisation la plus stable est celle qui permet de minimiser les interactions entre composants hydrophobes et molécules d'eau. Les lipides s'organisent le plus souvent en bicouches avec les queues apolaires au centre de la bicouche et les têtes polaires exposées au milieu aqueux (extérieur ou intérieur). Cette structure est refermée sur elle-même en une vésicule, qui isole un compartiment interne aqueux. Le libre passage de macromolécules hydrophiles d'un compartiment à l'autre est quasiment impossible, au contraire de celui de quelques solutés hydrophobes ou de petits solutés

hydrophiles qui diffusent librement au travers de la bicouche (Inoue 1974, Naoi *et al.* 1977, Deamer *et al.* 1986). L'épaisseur d'une bicouche est plus ou moins égale à 2 fois la longueur des plus grands lipides qui la composent. Le contenu de la bicouche, et notamment la présence de protéines, peut en augmenter l'épaisseur, qui reste toutefois inférieure à 1 nm.

*c. Structure des lipoplexes.*

La complexation des AN aux lipides mène à la formation de particules de structure très différente, dont la charge en surface et la taille sont différentes des préparations originales de liposomes, dépendant de la charge du ratio lipide / ADN (+ / -) (Pires *et al.* 1999). La structure des complexes liposomes-ADN a été caractérisée par diffraction aux rayons-X principalement (Radler *et al.* 1997, Koltover *et al.* 1998, 1999, Schmutz *et al.* 1999). Il existe 2 architectures basiques (Monkkonen *et al.* 1998),  $L_{\alpha}$  (organisation lamellaire avec des chaînes d'hydrocarbures fluides) et  $H_{II}$  (phase hexagonale), avec des transitions possibles d'un état vers l'autre (voir Figure 17). Ce sont des hyperstructures organisées, de nature cristaux liquides, dont l'environnement et la dynamique de formation ne sont pas encore bien expliqués (Schmutz *et al.* 1999, Radler *et al.* 1997). L'architecture lamellaire est constituée de brins parallèles d'ADN entourés de bicouches lipidiques fluides. Les phases hexagonales inverses  $H_{II}$  seraient préférables pour l'internalisation des lipoplexes, moins sujettes à l'augmentation de la taille des particules (Simberg *et al.* 2004, Wasungu *et al.* 2006). Des structures hexagonales normales  $H_I$  (Wasungu *et al.* 2006, Ewert *et al.* 2006) et des phases cubiques (Koynova *et al.* 2005) ont aussi été décrites.

**Figure 17 : ultrastructure d'un complexe liposome cationique / ADN.**  
 En jaune : couches phospholipidique du liposome. En bleu : hélices d'ADN.  
 D'après Koltover *et al.* 1998.





Les particules de liposomes obtenues après extrusion et observées en cryomicroscopie électronique, ont une morphologie bilamellaire invaginée qui a été bien caractérisée (Templeton 2002). Une hypothèse possible serait que l'interaction initiale de l'ADN avec la surface externe des vésicules unilamellaires induise une contraction de cette couche de lipides à cause de la neutralisation des charges, grâce à la réaction de condensation des contre-ions de Manning-Oosawa. Ceci mènerait à une inversion de la vésicule autour de l'ADN et formerait des vésicules de structure lamellaire où s'intercaleraient les chaînes d'ADN. La complexation avec les différents types d'AN, dont les ON, conduit à des ultrastructures équivalentes, suggérant un phénomène ubiquitaire de la condensation des AN (Schmutz *et al.* 1999).

## 2) Historique et diversité de lipides dans le contexte du transport d'AN.

### *a. Historique.*

Historiquement, le concept de liposome est rattaché aux observations d'A.D. Bangham en 1965 (Bangham *et al.* 1965), qui étudiait les phospholipides membranaires et le regroupement des cellules sanguines. Il découvrit que les phospholipides, composants majoritaires des membranes cellulaires, ont la propriété de former spontanément des assemblages globulaires sphériques en contact de l'eau. Si ces assemblages sont obtenus à partir de lipides retrouvés dans les membranes cellulaires, tels les phospholipides, ils sont dénommés liposomes, et vésicules lorsqu'ils sont formés à partir de molécules de synthèse.

Dès 1979, G.J. Dimitriadis (Dimitriadis 1979) utilisa les liposomes comme une « enveloppe » pour y incorporer de l'ADN par encapsulation, mais sans utiliser de lipide chargé. Par la suite, J.P. Behr (Behr *et al.* 1986) démontra qu'un lipide cationique protoné à pH physiologique et assemblé en liposomes pouvait complexer l'ADN et le condenser. L'année suivante, Felgner et collaborateurs réalisèrent les premières expériences de lipofection, terme désignant une transfection cellulaire par le biais des liposomes (Felgner *et al.* 1987). Ce liposome, du nom de Lipofectine (Invitrogen) est devenu par la suite le premier vecteur liposomal distribué commercialement et il est encore utilisé de nos jours. C'est typiquement le mélange d'un lipide cationique et d'un lipide neutre, respectivement le DOTMA (1,2-dioléoyloxypropyl-3-triméthylammonium) et le DOPE (dioléoyl phosphatidyléthanolamine) en proportion massique 1:1.

Depuis ces études pionnières, de nombreux lipides cationiques ont été développés et testés avec succès, que ce soit en modifiant la nature cationique du lipide (Felgner *et al.* 1994), ses chaînes d'acides gras (Rosenzweig *et al.* 2000) ou la formulation avec le lipide auxiliaire (Budker *et al.* 1996). Ce champ de recherche reste très actif et la diversité des formulations pouvant être testées ou restant à découvrir est très vaste.

La protection, le transport et l'activité d'ON par des liposomes ont été démontrés, mais le rendement de distribution dans le cytoplasme s'est avéré assez faible (Thierry *et al.* 1992, 1993). Dès 1993, les liposomes cationiques furent utilisés pour un premier essai de thérapie génique humaine (Nabel *et al.* 1993) et au total près de 8% des essais menés jusqu'à maintenant ont utilisé cette technique démontrant ainsi son intérêt. L'accident mortel survenu dans le cadre d'un essai de thérapie génique utilisant un vecteur viral (Marshall 1999), a relancé l'intérêt de la communauté scientifique vis-à-vis des vecteurs synthétiques et en particulier des liposomes cationiques.

Les travaux de vectorisation évoluent vers l'utilisation d'approches combinées entre différents vecteurs synthétiques : liposomes liés à des peptides, liposomes liés à des polymères cationiques. Les lipides sont ainsi de plus en plus utilisés comme des agents protecteurs tandis que les interactions électrostatiques avec l'ADN sont assurées par des polymères cationiques plus condensants.

#### *b. Lipides cationiques dérivés des acides gras.*

Ces lipides, qui comportent tous 1 ou 2 chaînes d'acides gras comme partie hydrophobe, peuvent être monovalents ou multivalents.

#### ◆ Les lipides monovalents.

Les lipides monovalents tirent leur charge positive d'une tête hydrophile portant un seul groupement amine. Ce peut être un groupement propyl ammonium, une amine quaternaire, comme pour le DOTMA (1,2-dioléoyloxypropyl-3-triméthylammonium) ou le DOTAP (1,2-dioléoyl-3-tri-méthylammonium propane), reliés aux chaînes d'acides gras respectivement par des liaisons éther et ester. Le DDAB (diméthyl dioctadécyl ammonium bromide) est un autre exemple de lipide cationique monovalent utilisé avec succès pour la lipofection (Dass *et al.* 2002). A la différence du DOTMA ou du DOTAP, sa tête polaire est située au contact de ses chaînes d'acides gras. Les lipides cationiques monovalents dérivés

des acides gras ont été les premiers lipides à avoir été testés et restent encore très utilisés pour la transfection cellulaire *in vitro*, en particulier couplés à des polymères cationiques ou à des systèmes de ciblage cellulaire.

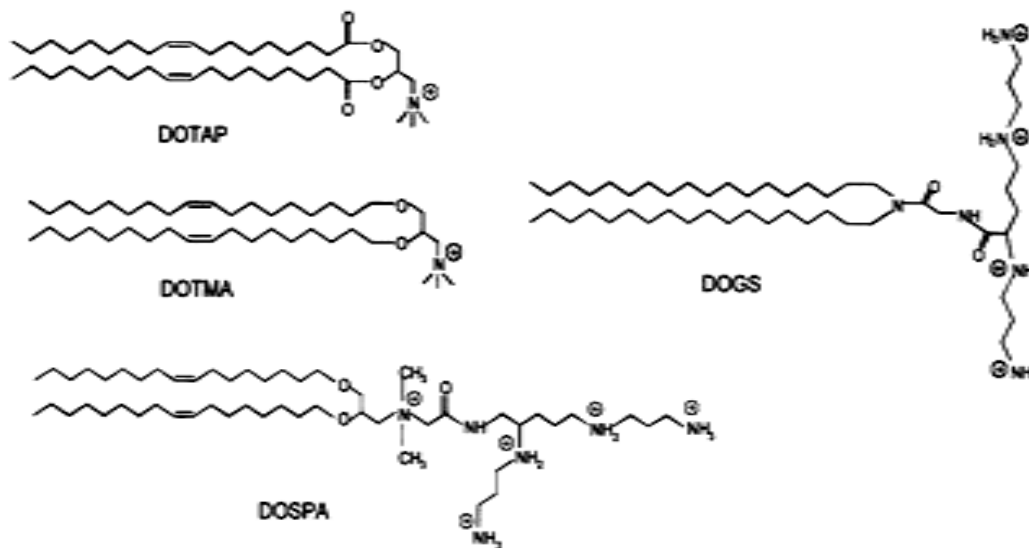
◆ Les lipides multivalents.

Les lipopolyamines sont des lipides multicationiques obtenus par couplage avec de la spermine ou de la polylysine. Ils interagissent avec l'ADN et le condensent grâce à leur groupe polaire cationique. Cependant, les lipopolyamines sont assez cytotoxiques à concentrations élevées (Staedel *et al.* 1994). En terme d'efficacité de lipofection, c'est désormais les lipides multivalents qui sont le plus souvent utilisés. Développés selon l'hypothèse qu'un plus grand nombre de charges positives peut renforcer les interactions avec l'ADN à transférer, les lipides cationiques multivalents dérivés des acides gras se sont révélés être plus performants que les lipides monovalents. Wheeler et collaborateurs (Wheeler *et al.* 1996) ont ainsi montré que l'augmentation du nombre d'amines par molécule améliorerait l'efficacité de transfection en augmentant l'affinité des contacts entre l'ADN et les molécules de lipide.

La tête hydrophile de ces lipides peut être constituée de polylysine (lipopolylysine) ou plus souvent de spermine comme pour le DOSPA (2,3- dioleoyloxy- N- [2(spermine-carboxamido)éthyl]-N, N-diméthyl 1-propanaminium trifluoroacétate). Le DOSPA associé au DOPE est distribué commercialement sous le nom de Lipofectamine (Invitrogen) et est le lipide cationique commercial le plus utilisé pour la transfection actuellement *in vitro*.

D'autres lipides cationiques multivalents dérivés d'acides gras ont été synthétisés, parmi lesquels : le DOGS (dioctadécyl amidoglycyl spermine) commercialisé sous le nom de Transfectam (Promega) ou encore le DOSPER (1,3-Di-oléoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamide). Le DOGS et le DOSPER portent une tête spermine différente dans la nature et la taille de l'espaceur et du linker. En raison d'une tête hydrophile plus large, ces lipides de forme conique s'assemblent plus facilement en micelles qu'en vésicules, contrairement aux lipides monovalents (Behr *et al.* 1989). Ces lipides sont donc souvent associés à un lipide auxiliaire neutre (co-lipide) pour former des liposomes stables. La propriété de ces lipides d'interagir plus efficacement avec l'ADN grâce à leurs multiples amines est cependant contrebalancée par une plus grande difficulté à le relâcher une fois les lipoplexes entrés dans la cellule (Ferrari *et al.* 1998).

**Figure 18** : structure de lipides cationiques dérivés d'acides gras.



*c. Lipides cationiques dérivés du cholestérol.*

L'utilisation du noyau stérol permet de moduler la fluidité de la bicouche lipidique des liposomes pour favoriser la stabilité avec des membranes cellulaires, qui contiennent du cholestérol. Comme pour les lipides dérivés d'acides gras, il existe 2 classes de lipides dérivés du cholestérol, distinguées selon leurs charges : les monovalents et les multivalents.

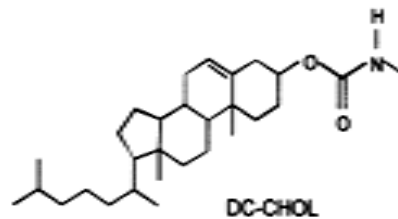
♦ Les lipides monovalents.

Les lipides à base de cholestérol cationisé rentrent dans les formulations liposomales les plus récentes, mais dès 1991, Gao et collaborateurs (Gao *et al.* 1991) testèrent avec succès le DC-Chol (3- $\beta$  [N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle]cholestérol). Ce lipide monovalent est constitué pour sa partie hydrophobe d'un noyau cholestérol, d'un court lien carbamoyle et d'un espaceur avec un groupement éthyl qui porte une amine tertiaire. Le DC-Chol a montré son efficacité pour le transfert d'ADN dans des cellules cancéreuses (Farhood *et al.* 1992, Cao *et al.* 2000). Dans des expériences de comparaison directe *in vivo*, il s'est montré nettement supérieur aux lipides cationiques plus «standards» dérivés des acides gras qu'ils soient mono ou multivalents (Egilmez *et al.* 1996). Les propriétés stabilisatrices du cholestérol dans les structures lipidiques et membranaires (Bhattacharya *et al.* 1996) constituent probablement une des raisons de l'efficacité de ce lipide et de ses dérivés.

◆ Les lipides multivalents.

Comme pour les lipides dérivés d'acides gras, des dérivés multivalents du DC-Chol ont été synthétisés et portent tous une tête polyamine. La spermine est le groupement polyamine le plus souvent utilisé mais son squelette carboné peut être plus ou moins long et différemment orienté. La tête polyamine peut être aussi liée au noyau cholestérol selon plusieurs types de liaison. Tout comme pour les lipides dérivés d'acides gras, les molécules multivalentes montrent une efficacité supérieure aux molécules monovalentes. Les travaux de Lee et collaborateurs ont montré que pour la transfection de l'épithélium pulmonaire, un lipide cationique à base de cholestérol et à tête spermine était aussi efficace qu'un vecteur adénoviral (Lee *et al.* 1996). Cependant la présence d'une tête polyamine sur le lipide élargit sa structure et contribue à favoriser une association micellaire au détriment d'une association en liposome. Par ailleurs, d'autres paramètres structuraux : espaceur, linker, interviennent dans l'efficacité finale du lipide et certains lipides monovalents peuvent se révéler supérieurs (Ghosh *et al.* 2002).

***Figure 19 : structure d'un lipide cationique dérivé du cholestérol.***



*d. Lipides neutres.*

Les co-lipides ou lipides auxiliaires (dits « helper »), bien qu'étant une classe de lipide non chargé à pH physiologique, se sont révélés être des composants essentiels dans la formulation finale des liposomes et leur capacité à transporter des AN. L'incorporation d'un co-lipide neutre dans la formulation en synergie avec un ou plusieurs lipides cationiques peut diminuer la toxicité et augmenter l'efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo* (Hong *et al.* 1997, Lasic 1997).

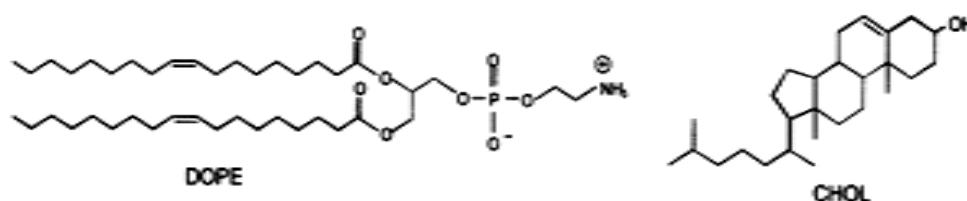
Majoritairement, le co-lipide le plus utilisé dans les formulations liposomales est le DOPE (dioléoyl L- $\alpha$  phosphatidylétanolamine). Plusieurs études (Hui *et al.* 1996, Mok *et al.* 1997) ont démontré que les liposomes composés d'un lipide cationique associé au DOPE en quantité équimolaire étaient bien plus efficaces pour la transfection d'ADN que les liposomes

formés uniquement avec un seul lipide cationique. Ces travaux ont prouvé également qu'un autre co-lipide neutre, le DOPC (dioléoyl phosphatidyl choline) était bien moins efficace dans ce rôle de lipide auxiliaire.

Le rôle du DOPE est de favoriser la transition entre une structure en bicouche et une structure hexagonale, et ce sous l'influence du pH (Koltover *et al.* 1998). Cette particularité rend les liposomes composés de DOPE « pH sensibles » et il a été démontré que ces liposomes peuvent fusionner ou déstabiliser une membrane cible comme par exemple celle des endosomes (Felgner *et al.* 1994, Harvie *et al.* 1998, Zelphati *et al.* 1996). L'acidification progressive de l'endosome favoriserait donc la fusion entre sa membrane et celle de liposomes composés de DOPE. Le DOPE serait également impliqué dans la libération de l'ADN du liposome. En effet, son groupement éthanolamine peut interagir avec les groupements phosphates de l'ADN en affaiblissant les interactions électrostatiques entre le lipide cationique et l'ADN (Harvie *et al.* 1998). Le DOPE constitue le lipide neutre le plus utilisé pour obtenir une activité optimale (Felgner *et al.* 1994, Farhood *et al.* 1995).

Le cholestérol a aussi été utilisé comme co-lipide pour préparer des liposomes. Ceux-ci se sont révélés plus stables que ceux contenant du DOPE mais aussi moins efficaces. Par contre, les liposomes contenant le cholestérol sont bien plus efficaces *in vivo* que ceux utilisant le DOPE en association avec un lipide cationique dérivé d'acide gras (Liu *et al.* 1997, Tavitian *et al.* 2002).

**Figure 20 : structure de lipides neutres.**



Si la diversité des formulations et lipides testés a permis d'augmenter nos connaissances dans le domaine de la vectorisation elle a aussi paradoxalement compliqué l'établissement de conclusions claires et définitives sur la relation structure/fonction/efficacité. Malgré ce manque de clarté, l'efficacité avérée des nouvelles formulations et la possibilité

d'optimisation motivent la réalisation d'études complémentaires pour obtenir un vecteur lipidique polyvalent.

Pour obtenir une formulation optimale, on peut contrôler :

- ◆ les lipides utilisés
- ◆ la thermodynamique
- ◆ la technique de formulation.

### 3) Techniques de formulation des liposomes.

Une formulation caractéristique de liposomes consiste d'abord à mélanger plusieurs lipides différents avant hydratation. Puisque les liposomes sont constitués d'une bicouche lipidique et d'une phase interne aqueuse, ils peuvent incorporer des matériaux hydrosolubles ou liposolubles (Tomii 2002). On utilise les techniques classiques de formation de liposomes utilisées pour la délivrance d'autres principes actifs.

Les méthodes conventionnelles comportent 4 phases principales : débarrasser les lipides des solvants organiques, la dispersion de lipides dans un milieu aqueux, la purification des liposomes obtenus et l'analyse des produits (pour revue Mozafari 2005).

Pour encapsuler des agents bioactifs, les liposomes peuvent aussi être préparés par :

- la technique d'inversion de phase
- la dialyse de détergents
- la technique d'injection / vaporisation à l'éther
- la méthode de déshydratation – réhydratation
- la méthode d'injection à l'éthanol
- la technique de chauffage.

La plupart de ces techniques sont à l'origine de MLV ou de LUV et donnent en général des mixtures de liposomes hétérogènes. Il est alors possible de rajouter une étape supplémentaire :

- la technique d'extrusion
- la méthode de congélation / décongélation
- la technique de sonication.

La majorité des préparations de liposomes impliquent l'utilisation de solvants organiques volatiles (chloroforme, éther, méthanol) en première étape pour dissoudre les

lipides. Ces solvants affectent la structure chimique des substances encapsulées et influencent la stabilité des vésicules, ce qui peut générer une cytotoxicité. En général, ces résidus de solvants, aussi appelés impuretés volatiles organiques, n'ont aucun intérêt thérapeutique et peuvent affecter la santé humaine ainsi que l'environnement (Cortesi *et al.* 1999, Vemuri *et al.* 1995, Deamer *et al.* 1983).

*a. Méthode conventionnelle.*

La méthode la plus simple pour préparer les liposomes consiste à évaporer le solvant organique dans lequel sont dissous les lipides, puis à les remettre en suspension dans un solvant aqueux (Bangham *et al.* 1965). Dans ce dernier, le film lipidique s'hydrate et les phospholipides s'associent de manière à ne pas exposer leurs chaînes acyles au solvant. Il en résulte la formation de bicouches, qui se referment en emprisonnant du solvant. Des bicouches peuvent enfermer d'autres bicouches de plus petite taille. Ainsi, lors de cette préparation, des MLV se constituent en bicouches lipidiques concentriques et séparées les unes des autres par des couches de solvant. Ces liposomes ont des tailles très hétérogènes et possèdent un volume aqueux interne relativement faible par rapport au poids du lipide (Lorin 2004). Si cette méthode est la plus simple, elle est limitée par le taux d'encapsulation souvent faible (Mozafari 2005).

*b. Inversion de phase.*

Dans la méthode d'évaporation en phase inverse, un solvant organique non miscible dans l'eau et dans lequel les vésicules préformées sont solubles est utilisé : diéthyléther, isopropyléther, mélanges de ces éthers avec du chloroforme ou du méthanol (Szoka *et al.* 1978, Papahadjopoulos *et al.* 1967a, 1967b). Les substances à encapsuler sont dans une phase aqueuse et ajoutées puis le système est agité à l'aide d'un vortex ou soniqué brièvement. Une émulsion inverse stable est formée. Le taux d'encapsulation est en général élevé, mais l'élimination complète des solvants est un problème et les vésicules formées ne sont pas très homogènes en taille et en nombre de bicouches.

*c. Dialyse de détergent.*

Mélanger une solution aqueuse de lipides avec une solution aqueuse micellaire d'un détergent en excès entraîne la formation d'un mélange de micelles détergent-lipides, en équilibre avec les molécules de détergent monomériques non-micelles (Luna *et al.* 1977). Après élimination du détergent par dialyse (Milsman *et al.* 1978), les micelles se



transforment en vésicules détergent-lipides puis en vésicules lipidiques sans détergent. Ces vésicules sont principalement unilamellaires et leur taille dépend des conditions expérimentales, comme la concentration en lipides, la vitesse de dialyse ou le rapport initial détergent-lipides (Rotenberg *et al.* 1991, Tauskela *et al.* 1992).

*d. Injection à l'éther.*

Dans la méthode de vaporisation à l'éther, les phospholipides sont dissous dans du diéthyléther ou dans un mélange diéthyléther-méthanol et sont injectés dans une solution aqueuse contenant le soluté à encapsuler chauffé (Deamer *et al.* 1976, Schieren *et al.* 1978). Les LUV sont formés par évaporation du solvant organique. La concentration lipidique dans le solvant organique n'affecte pas la taille des liposomes. Une variante de cette technique utilise de l'éther de pétrole à la place du diéthyléther. Cette méthode permet d'encapsuler aussi bien des protéines que des AN. Par contre, avec cette technique les liposomes neutres tendent à s'agréger, la distribution de taille est plutôt hétérogène et l'efficacité d'encapsulation est faible.

*e. Déshydratation / réhydratation.*

La déshydratation de vésicules suivie d'une réhydratation contrôlée (proche de la température de transition de phase ou  $T_m$ ), provoque la fusion des petites vésicules préformées, résultant en vésicules multilamellaires avec de hauts taux d'encapsulation (Kirby *et al.* 1984, Deamer *et al.* 1982).

*f. Injection à l'éthanol.*

L'injection d'une petite quantité d'une solution éthanolique, constituée de lipides amphiphiles, dans une solution aqueuse induit rapidement la formation de vésicules où les parties hydrophiles sont exposées à l'eau (Batzri *et al.* 1973, Kremer *et al.* 1977). Du méthanol peut être utilisé à la place de l'éthanol mais est plus toxique. Ces 2 alcools sont cependant miscibles dans l'eau. A moins de les éliminer par dialyse, les alcools persistent dans la préparation de vésicules. En fonction des conditions expérimentales (concentration en lipides, vitesse d'ajout de la solution alcoolique), les vésicules sont plus ou moins homogènes au niveau de la taille et du nombre de bicouches (Walde *et al.* 2001).

*g. Chauffage.*

Une méthode récente pour la production rapide de liposomes, sans l'utilisation de produits chimiques à risque a été décrite. Cette méthode implique l'hydratation des composés lipidiques dans un milieu aqueux, suivi du chauffage de ces composés en présence de glycérol (3% v/v) jusqu'à 120°C (Mortazavi *et al.* 2007, Mozafari *et al.* 2002, 2005). Le glycérol est hydrosoluble, avec la capacité d'augmenter la stabilité des vésicules lipidiques, mais n'a pas besoin d'être éliminé du produit final. La méthode de chauffage n'implique pas de procédure de stérilisation pour obtenir des liposomes avec une structure intacte.

*h. Extrusion.*

Le principe est de faire passer une suspension de liposomes, dont le diamètre est supérieur ou égal à 1µm, au travers d'un filtre asymétrique dont la taille des pores de la surface interne est d'environ 1µm, par forte pression mécanique (Hope *et al.* 1987, MacDonald *et al.* 1991). Les filtres peuvent être par exemple en céramique, en polycarbonate ou en oxyde d'aluminium. L'appareil utilisé est appelé communément extrudeur. Le système d'extrusion comprend un appareil de filtration de type cartouche ainsi qu'une pompe et une paire de récipients contenant les solutions de liposomes à traiter. La pompe est connectée aux récipients par l'intermédiaire d'une série de soupapes pour assurer l'écoulement du fluide de l'avant vers l'arrière de l'appareil, ou dans le sens inverse. Depuis le récipient, la suspension de liposomes traités peut être transférée vers un système de remplissage stérile. Les liposomes traités ont une taille moyenne (80 à 400nm) dépendant du diamètre des pores du filtre utilisé et du nombre de cycles de filtration.

*i. Congélation / décongélation.*

La méthode de congélation / décongélation consiste à répéter plusieurs fois la congélation d'une solution de MLV dans l'azote liquide à -195°C, puis à la décongeler à une température avoisinant le T<sub>m</sub> (Pick 1981). Typiquement, les cycles de congélation / décongélation sont répétés 3 à 6 fois. Cette technique équilibre le cœur aqueux des vésicules et la phase externe aqueuse, résultant en une augmentation du taux d'encapsulation et menant à une plus grande population de vésicules multilamellaires et l'élimination des petites vésicules présentes (Walde *et al.* 2001). Cette méthode mène aussi à la fragmentation des MLV en SUV en présence d'électrolytes (MacDonald *et al.* 1994).

*j. Sonication.*

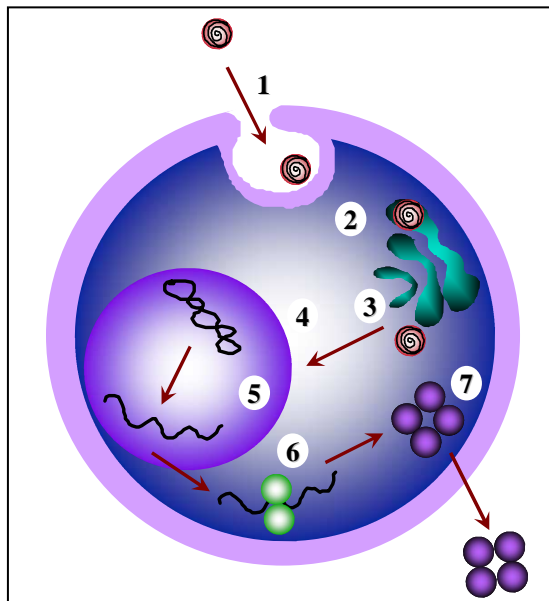
Le traitement par ultrasons (sonication) d'une suspension de liposomes de type MLV produit des SUV, d'un diamètre minimum de 20nm (Huang 1969). Certains sonicateurs (type sonde à immerger) délivrant beaucoup d'énergie peuvent créer une surchauffe de la préparation et une dégradation des vésicules, et peuvent contaminer les préparations avec le métal de la sonde. La taille et la distribution moyenne sont influencées par la composition, la concentration, la température ainsi que le volume, le temps et la puissance de sonication. Les grosses particules persistantes peuvent être éliminées ensuite par centrifugation. A cause du haut degré de courbures de leurs membranes, les SUV sont instables et vont spontanément reformer de grosses vésicules par fusion, une fois stockés en-dessous de leur  $T_m$ .

Ces techniques permettent d'obtenir des liposomes et des lipoplexes d'une structure stable, supportant bien les dilutions. Au contraire, les systèmes thermodynamiquement réversibles, comme les micelles et les émulsions, ont tendance à s'agréger ou à se désintégrer (Chung *et al.* 2001). Les liposomes peuvent néanmoins s'agréger à hautes concentrations en lipides ou en présence de certains ions multivalents (Jones 1995). Recouvrir les particules colloïdales non chargées avec des polymères hydrophiles non-ioniques, comme le PEG, rend les liposomes plus stables contre les interactions non-spécifiques et les auto-agrégations (pour revue Ulrich 2002).

4) Mécanismes d'entrée dans la cellule.

L'entrée des lipoplexes dans la cellule fait intervenir principalement, en absence de sérum, des interactions électrostatiques entre les complexes chargés positivement et la surface cellulaire chargée négativement (Pires *et al.* 1999). Plusieurs composants de la surface cellulaire interviendraient : composants de la matrice cellulaire, phospholipides, glycoprotéines, protéoglycans (héparanes sulfates). Le lipoplexe peut fusionner directement avec la membrane plasmique, ou être pris en charge par endocytose dans la cellule.

**Figure 21 : principales étapes d'entrée d'un liposome cationique complexé avec un AN dans la cellule. D'après Thierry et al. 1998.**



Dans le cas de l'endocytose (voir Figure 21) via les clathrines, la voie d'internalisation oblige les lipoplexes à traverser les compartiments endosomaux, précoces puis tardifs. Leurs caractéristiques leur permettent de sortir de ces compartiments et de ne pas être dégradés par les compartiments plus acides comme les lysosomes. Une fois le complexe dissocié, les ON, suffisamment petits, peuvent diffuser dans le noyau en passant par les pores nucléaires. Dans les cas de la fusion et des autres voies d'endocytose, les particules ne passent à priori pas par les endosomes avant de pénétrer dans le noyau.

#### a. Endocytose.

Il est bien établi que les lipoplexes entrent de façon prédominante par endocytose dans les cellules (Shi *et al.* 2004, Harashima *et al.* 2001, Zelphati *et al.* 1996, Zuhorn *et al.* 2002). Les cellules eucaryotes exploitent diverses voies d'endocytose et l'internalisation des lipoplexes pourrait impliquer :

- l'endocytose médiée par les clathrines via les puits recouverts (Kirkham *et al.* 2005),
- une voie d'endocytose indépendante des clathrines dont la phagocytose (Ulrich 2002),
- la macropinocytose (Khalil *et al.* 2006), et
- l'endocytose médiée par les cavéoles (Nichols 2003).

La phagocytose ne concerne que certaines cellules spécialisées comme les macrophages, les monocytes et les neutrophiles (Wasungu *et al.* 2006). L'endocytose via les cavéoles, surtout décrite pour les polyplexes, est peu commune pour les lipoplexes.

Un facteur important et déterminant la nature de la voie d'internalisation d'endocytose est la taille des lipoplexes (Rejman *et al.* 2004). Lors d'une endocytose médiée par les récepteurs, les petites particules (< 250nm de diamètre) se lient non-spécifiquement aux récepteurs de la surface cellulaire, sont internalisées par la voie impliquant les clathrines principalement et forment des vésicules recouvertes : c'est un mécanisme non spécifique. Ensuite, leurs manteaux sont éliminés et les vésicules fusionnent avec les lysosomes, ce qui induit une rupture des membranes lipidiques, relarguant leur contenu. Les particules de 500nm et plus seraient endocytées via les cavéoles. Les lipoplexes seraient protégés dans la cellule dans des cavéosomes, et pourraient rejoindre ensuite les compartiments des endosomes (Wasungu *et al.* 2006).

Le lipoplexe peut être dégradé dans un environnement à bas pH, ou il peut fusionner directement avec la membrane endosomale ou lysosomale (pour revue Ulrich 2002). Il semblerait que certains lipoplexes véhiculant des ON échapperaient aux endosomes (Zelphati *et al.* 1996). Selon ces auteurs, des contacts se feraient entre les lipides cationiques des lipoplexes et les lipides anioniques de la surface membranaire des endosomes, résultant en un flip-flop, puis en une déstabilisation des lipoplexes et dissociation avec les ON ou l'ADN chargés négativement et enfin leur relargage dans le cytoplasme. Cependant, les lipides anioniques ne seraient pas forcément nécessaires pour permettre ce phénomène (Gordon *et al.* 2005). Par contre, les lipides neutres comme le DOPE joueraient un rôle crucial en améliorant la sortie des endosomes, en adoptant une phase hexagonale dans le lumen des endosomes, ce qui déstabiliserait la membrane endosomale (Fattal *et al.* 2004, Zuhorn *et al.* 2005).

#### *b. Fusion.*

La fusion permettrait la délivrance de plus d'AN dans la cellule car cette voie ne passe pas par les endosomes tardifs (Templeton 2002, Duzgune *et al.* 1999). Des études suggéreraient que la fusion permet de délivrer l'ADN directement dans le cytoplasme (Felgner *et al.* 1987). Cependant, pour d'autres auteurs, l'ADN serait exclu à la surface cellulaire lors de la fusion et ne rentrerait donc pas dans la cellule (Elouahabi *et al.* 2005).

Certains lipides (DOTAP, DOTMA, DOPE, CL) et polymères (PEG) facilitant la fusion des lipoplexes avec la membrane plasmique cellulaire ont été décrits (Goryacheva *et al.* 2005, Pires *et al.* 1999, de Lima *et al.* 1999, Zhang *et al.* 2007, Felgner *et al.* 1987). Ainsi, les cations divalents induiraient la fusion des liposomes anioniques (Duzgunes *et al.* 1999), les anions multivalents, les ON et l'ADN, provoqueraient la fusion des liposomes cationiques (Duzgunes *et al.* 1989, Rupert 1985, Gershon 1993).

Restant très peu documentée dans la littérature en comparaison avec la voie d'endocytose, les données restent incertaines et se contredisent souvent. A ce jour, la voie de pénétration des lipides par fusion n'a pas été clairement démontrée.

### c. *Pénétration dans le noyau.*

Il existe plusieurs barrières au trafic nucléo-cytoplasmique d'un plasmide (Lechardeur *et al.* 2006).

- ◆ Le cytosquelette (microtubules et microfilaments) restreint la mobilité par diffusion de l'ADN dans le cytoplasme.
- ◆ L'ADN est soumis aux dégradations par les nucléases dans le cytosol.
- ◆ Le plasmide ne pénètre pas dans le noyau par diffusion et le transport est peu efficace.
- ◆ L'activité transcriptionnelle de l'ADN est limitée dans le noyau.

Les liposomes complexés aux AN permettraient l'entrée des ON libres dans le noyau, alors que les lipides restent localisés dans le cytoplasme en des zones périnucléaires, là où les endosomes sont recyclés et confinés. En fait, les ON se dissocient du complexe dans les endosomes, et s'accumulent rapidement dans le noyau en pénétrant par diffusion (Zelphati *et al.* 1996, Chin *et al.* 1990, Leonetti *et al.* 1991, Thierry *et al.* 1992). En effet, jusqu'à 40kDa les molécules diffusent passivement via le complexe du pore nucléaire ; les molécules supérieures à 60kDa doivent être prises en charge par les protéines du complexe, dont les importines, via un mécanisme énergie-dépendant (Talcott *et al.* 1999). Des AN de 250 paires de bases (soit environ 160kDa) pourraient cependant encore traverser les pores nucléaires par diffusion (Leonetti *et al.* 1991, Lukacs *et al.* 2000).

## 5) Limitations.

Les principaux inconvénients des lipides cationiques sont (pour revue Mountain 2000) :

- leur toxicité,
- l'instabilité et l'hétérogénéité des formulations,
- leur inactivation dans le sang,
- la faible efficacité de transfection,
- leur faible ciblage.

L'inactivation des liposomes par les protéines sériques a été décrit *in vitro* et *in vivo*, et concerne aussi bien les lipides cationiques qu'anioniques (Hoekstra *et al.* 1979, Lee *et al.* 1992). Ainsi, en présence de sérum leur internalisation serait grandement diminuée voire complètement inhibée. Dans la circulation sanguine, les opsonines, protéines plasmatiques, sont adsorbées par des interactions hydrophobes fortes aux liposomes et leur confèrent un marquage du non-soi : ils sont donc reconnus par l'organisme comme des corps étrangers et seront phagocytés par les macrophages hépatiques, aussi appelés cellules de Kupffer, et le système réticulo-endothélial.

La toxicité des particules est le principal frein à l'exploitation des liposomes en essai clinique. Il existe une relation entre toxicité et structure chimique du lipide cationique.

◆ Têtes hydrophiles. Les propriétés physicochimiques de la tête polaire auraient une influence. En effet, le caractère toxique est associé à la nature cationique des vecteurs (Moreau *et al.* 2002), principalement déterminé par les groupes hydrophiles. Ainsi, les amines quaternaires au niveau des têtes polaires sont plus toxiques que les amines tertiaires. Le remplacement du groupe amine par un hétérocycle, comme le pyridinium ou la guanidine, diminue la charge positive de la tête cationique et diminuerait baisserait significativement la toxicité du lipide cationique.

◆ Bras espaceurs. Leur nature aurait des conséquences sur la stabilité du lipide et donc sur sa toxicité une fois dégradé : les linkers de type éther seraient plus stables que les linkers de type ester et amide (Freedland *et al.* 1996, Leventis *et al.* 1990, Farhood *et al.* 1992).

◆ Queues hydrophobes. La longueur des chaînes hydrophobes pourrait avoir une importance capitale dans la cytotoxicité du lipide (Floch *et al.* 2000, Lv *et al.* 2006). En effet, certains lipides cationiques possèdent de très longues queues hydrophobes, comme le DOTAP, le DOTMA et le DOGS par exemple. Il y a 2 types de groupes hydrophobes : les chaînes

aliphatiques et les chaînes dérivées du cholestérol. Les chaînes aliphatiques, constituées d'une seule queue, sont en général plus toxiques et moins efficaces que les queues constituées de 2 chaînes (Lv *et al.* 2006).

♦ Taille des complexes et potentiel zêta ( $\zeta$ ). La taille des complexes liposomes-AN a une importance dans la cytotoxicité engendrée. Le potentiel  $\zeta$  est aussi en cause, puisque qu'en théorie plus le complexe sera chargé positivement en surface, et plus il sera toxique *in vitro* et *in vivo* (Friend *et al.* 1996, Dass *et al.* 2002, Lv *et al.* 2006).

*In vitro*, les effets cytotoxiques dépendent en majeure partie de la lignée cellulaire utilisée et de la dose de lipoplexes ajoutée aux cellules. La cytotoxicité des liposomes est donc probablement liée à une mauvaise adaptation du lipide à sa cible et le développement de nouvelles molécules garantira leur plus grande innocuité.

*In vivo*, des études ont montré que l'injection systémique de lipoplexes pouvait provoquer une hypothermie sévère puis la mort (Litzinger *et al.* 1996), une activation du complément (Barron *et al.* 1998), une toxicité au niveau du foie (Mohr *et al.* 2001) certainement due à la nature très cationique des particules, une toxicité au niveau des reins (Madry *et al.* 2001), des problèmes cardio-vasculaires dus à l'aggrégation des particules dans les artères (Wright *et al.* 1998), l'activation de cytokines accompagnée de la nécrose de cellules pulmonaires (Freimark *et al.* 1998) et une toxicité au niveau des globules rouges (données non publiées) chez les animaux de laboratoire. Les effets toxiques observés *in vivo* sont la conséquence directe d'une injection massive de lipoplexes. Par conséquent, une étude de la biodisponibilité et de la dynamique des lipoplexes *in vivo*, permettrait d'éviter des effets secondaires. Une administration progressive permettrait également de diminuer ces effets.

Si le caractère toxique des liposomes est essentiellement dû à une absence d'optimisation de la transfection vis-à-vis de sa cible, il ne constitue pas, seul, une limitation à l'utilisation de ces vecteurs.

#### 6) Liposomes liés à des polymères cationiques.

Plusieurs groupes ont tenté de cumuler les spécificités des liposomes et des polymères cationiques, en formant avec les AN des complexes appelés lipopolyplexes. Quelques exemples sont listés (voir Tableau 8).



**Tableau 8 : exemples de lipopolyplexes utilisés pour la transfection.**

*CHEMS* : cholestéryl hemisuccinate. *DOPS* : dioléoyl phosphatidylsérine. *pDMAEMA* : poly(2-diméthyléthylaino) éthyl méthacrylate. *HDHE* : L-histidine-(N,N-di-n-hexadécylamine)éthylamide.

COMPLEXES			REFERENCE
POLYMERE(S)	LIPIDE(S)	AN	
PEG Poly-L-lysine	DOPE / CHEMS / Folate	ADN	Lee <i>et al.</i> 1996
PEG Poly-L-lysine	DOPE / DOPS / Folate		
PEI Poly-L-lysine	DOTAP	ADN	Foglieni <i>et al.</i> 2000
pDMAEMA	Phosphatidylcholestérol / Phosphatidylcholine / Cholestérol	ADN	Mastrobattista <i>et al.</i> 2001
Protamine	DOTAP / Cholestérol	ADN	Tsai <i>et al.</i> 2002
Protamine PEG (+ motifs RGD)	DSPE	ADN	Harvie <i>et al.</i> 2003
PEI branchée ou linéaire Poly-L-lysine	DOCSPER DOSPER DOTAP	ADN	Pelisek <i>et al.</i> 2006
PEI branchée ou linéaire	DOTAP / Cholestérol	ADN	Garcia <i>et al.</i> 2007
Poly-L-lysine	DOCSPER	ADN	Golda <i>et al.</i> 2007
Poly-L-lysine histidylée PEG	HDHE / Cholestérol	ARNm ADN	Mockey <i>et al.</i> 2007

L'ajout en surface des liposomes de molécules de PEG, aussi appelé pégylation, améliore l'efficacité de transfection en améliorant la solubilité et la stabilité des complexes et en réduisant les interactions aspécifiques avec les biomolécules (pour revue De Smedt *et al.* 2000). Le PEG masque les charges positives à la surface des complexes et augmente la demi-vie des complexes SUV / ADN dans la circulation sanguine (Gabizon *et al.* 1994, Papahadjopoulos *et al.* 1991, Tranchant *et al.* 2004). Cette 2<sup>ème</sup> génération de liposomes furtifs offre l'avantage de ne pas être reconnu comme étranger par les opsonines dans la circulation ; il n'y aura pas reconnaissance des particules par les cellules de Küppfer au niveau du foie, donc les lipoplexes ne seront pas dégradés par ces macrophages hépatiques.

Globalement, le mélange liposomes / polymères cationiques a permis d'améliorer très significativement l'efficacité de transfection obtenue avec les liposomes ou les polymères

seuls, tout en diminuant leur cytotoxicité (Ibanez *et al.* 1996, Guo *et al.* 2000), ce pour plusieurs types cellulaires testés et même en présence de sérum dans le milieu de transfection. Des différences d'efficacité ont néanmoins été observées selon l'ordre de mélange des 3 composants des lipopolyplexes : lipides cationiques / AN + polymères cationiques ou polymères cationiques / AN + lipides cationiques. Dans certaines études une bonne résistance a aussi été démontrée vis-à-vis des nucléases (Ibanez *et al.* 1996, Shangguan *et al.* 2000). Récemment, une des études a même montré une efficacité de lipopolyplexes à base d'ARNm *in vivo*, dans le cadre d'une vaccination contre un mélanome murin (Mockey *et al.* 2007).

La taille des particules obtenues est en général comme suit : lipoplexes > lipopolyplexes > polyplexes. Les polymères cationiques permettent en général une plus forte condensation des particules. De plus, la charge globale des particules complexées ou potentiel  $\zeta$ , peut devenir négative, selon la quantité de polymères utilisée et le ratio appliqué. Cette donnée est importante, car il est rare d'obtenir des complexes chargés positivement et négativement, à partir de liposomes ou de polymères cationiques.

Ces études permettent d'allier les avantages des liposomes et des polymères cationiques et s'avèrent très encourageantes, même si le nombre d'expériences réalisées *in vivo* reste faible à ce jour. Comme pour les lipoplexes, il est rare d'obtenir avec les polyplexes des particules négatives ou avoisinant la neutralité. Le phénomène d'auto-condensation respective des composés cationiques et de l'AN paraît conduire thermodynamiquement à des complexes de charges globalement positives.

#### 7) Liposomes liés à des peptides.

La membrane cellulaire représente une barrière souvent difficile à pénétrer pour permettre la délivrance d'AN ou de molécules thérapeutiques. En outre, les molécules qui réussissent à pénétrer dans la cellule par une voie d'endocytose peuvent être dégradées dans les compartiments des endosomes ou des lysosomes. Par conséquent, de nombreuses tentatives ont été réalisées pour détourner les voies d'endocytose, en permettant une délivrance directe de macromolécules d'intérêt dans le cytoplasme des cellules.

Plusieurs études permettant d'associer les stratégies liposome et peptide pour la vectorisation de molécules ont été proposées. Le groupe de V.P. Torchilin possède une grande expertise dans ce domaine. Il a tout d'abord synthétisé des liposomes de type

phosphatidylcholine (PC) / cholestérol / polyéthylène glycol (PEG) puis lié le peptide TAT, à la surface de ces liposomes directement ou via des bras espaceurs. Ces particules, de taille moyenne (150 à 200nm), pénétreraient rapidement et efficacement dans les cellules *in vitro* et migreraient jusqu'à la zone périnucléaire (Torchilin *et al.* 2001). Le même groupe a ensuite étudié des complexes peptide TAT / liposomes / ADN, à partir des mêmes lipides utilisés précédemment. Ces particules non toxiques pénètrent dans les cellules mais ne parviennent cependant pas jusqu'au noyau. L'étude montre que, même au bout de plusieurs heures, les liposomes restent associés au peptide TAT (Torchilin *et al.* 2003).

D'autres études ont montré que la Pénétratine et TAT amélioraient l'efficacité de pénétration des liposomes en fonction du nombre de molécules attachées à la surface de la membrane. L'internalisation, peptide- et type cellulaire dépendante, pouvait être améliorée par seulement 5 molécules de peptides par liposome (Tseng *et al.* 2002). L'utilisation d'inhibiteurs a confirmé que les liposomes-TAT étaient internalisés par endocytose, impliquant les héparanes sulfates des protéoglycans (Fretz *et al.* 2004).

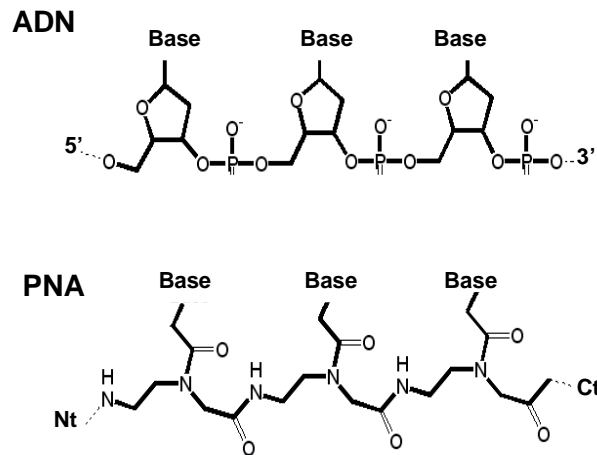
Antp et TAT ont montré une internalisation plus importante une fois couplés à des liposomes unilamellaires de petite taille (100nm), dans les cellules tumorales et dendritiques. L'internalisation était dépendante du temps et de la concentration. Les liposomes-Antp ont été considérés comme un système de transport à l'origine de l'augmentation de la délivrance des molécules encapsulées dans les liposomes (Marty *et al.* 2004).

Une étude récente a mis en évidence une augmentation de l'efficacité de transfection des liposomes quand le peptide TAT était lié à leur surface. Il a été observé en parallèle une toxicité significative, une diminution du potentiel zéta et une augmentation de la taille des particules. Le processus d'entrée des complexes serait énergie-dépendant, plus précisément par une voie d'endocytose dépendante des clathrines (Vandenbroucke *et al.* 2007).

Enfin, des études originales ont mis en oeuvre des complexes constitués de liposomes (LFA) ou de polymères (PEI) commerciaux, et d'oligomères PNA / ADN, pour augmenter l'efficacité de transfection. Les PNA (Peptide Nucleic Acid) sont une nouvelle chimie d'ON (voir Figure 22), ressemblant à l'ADN, avec un fort potentiel pour la stratégie antisens. De ce fait, une hybridation entre un PNA et un ADN ou un ON est possible par des liaisons hydrogènes. Les oligomères véhiculés par les 2 types de vecteurs ont montré une bien

meilleure efficacité de transfection que les constituants du complexe seuls, avec une internalisation jusqu'au noyau (Rasmussen *et al.* 2006, Shiraishi *et al.* 2006).

**Figure 22 : structures chimiques de l'ADN (chargé négativement) et du PNA (neutre).**



Malgré ces études alliant liposomes et peptides / PNA, les limitations rencontrées par les liposomes ne sont toujours pas résolues : cytotoxicité, manque d'efficacité dans les milieux biologiques.

#### 8) Applications et utilisation en thérapie génique.

Sur 1.283 essais cliniques concernant la thérapie génique, soit environ 3% des essais totaux, 102 concernent les liposomes en tant que vecteur d'AN, de molécules actives ou de drogues. Quelques essais cliniques intéressants sont présentés ici (voir Tableau 9).

**Tableau 9 : essais cliniques des liposomes dans le cadre de la thérapie génique.**

Données issues de l'U.S. National Institutes of Health (<http://clinicaltrials.gov/ct/gui>).  
 NCI : National Cancer Institute ; NIDDK : National Institute of Diabetes and Digestive and  
 Kidney Diseases ; NCRR : National Center for Research Resources.

MOLECULE	PHASE CLINIQUE	NOMBRE PATIENTS	PATHOLOGIE	ANNEE	INVESTIGATEUR
Complexe lipide / CFTR administré par voie intranasale	I	9	Mucoviscidose	1995-2006	NIDDK, NCRR
Complexe lipide / gène pGT-1	I (en cours)	9	Mucoviscidose	1995-.....	NIDDK
ADN antisens EGFR et DC-chol	I (en cours)	20-36	Carcinome (tête, cou)	1999-.....	NCI
Complexe DOTMA cholestérol / plasmide interleukine-2	II (en cours)	80	Carcinome (tête, cou)	2000-.....	NCI
LErafAON (ON / liposome)	I	30	Cancers (tumeurs solides)	2001-2005	Neopharm
DOTAP:Chol-fus1	IV (en recrutement)	30	Cancer des poumons	2003-.....	M.D. Anderson Cancer Center
Cytarabine liposomale	II (en recrutement)	30	Lymphome de Burkitt associé au HIV	2006-.....	NCI

Ces essais concernent principalement ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical/](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/)) :

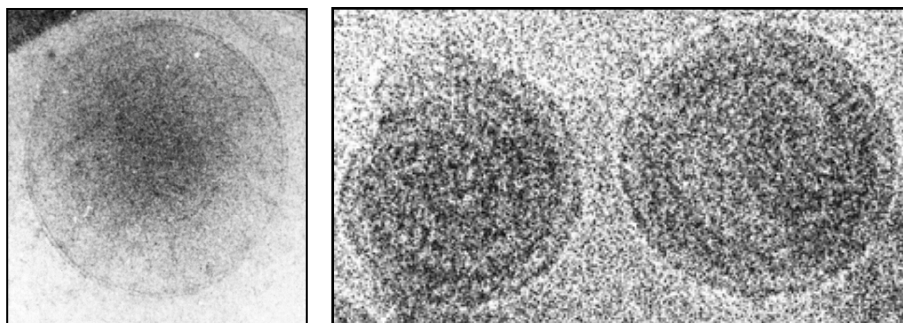
- ◆ les cancers (81.4%) : tumeurs solides, carcinomes, mélanomes, cancers du cerveau, du sang, du sein, de la prostate, des poumons, du colon, de l'ovaire
- ◆ la mucoviscidose (9.8%)
- ◆ les maladies cardiovasculaires (3.9%).



présence induit la neutralisation des charges cationiques par ses charges négatives (Koltover *et al.* 1998). De plus, ses groupes amines entreraient en compétition avec les lipides cationiques pour les groupements phosphate de l'ADN, ce qui causerait une accélération de la dissociation du complexe et permettrait plus facilement l'échappement de l'ADN du compartiment des endosomes (De Lima *et al.* 1999, Harvie *et al.* 1998). En présence de NaCl, ceci mènerait à une diminution du potentiel de surface des complexes, ce qui faciliterait les interactions inter-membranaires et induirait le changement de phase.

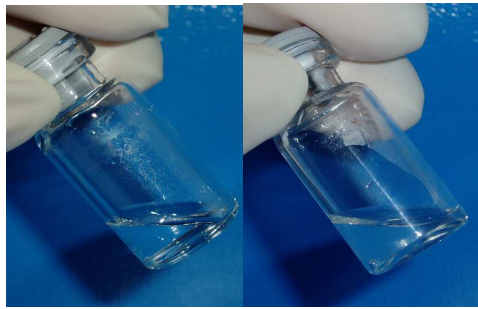
Le mélange de ces lipides avec un excès d'eau, est à l'origine de particules de type SUV, dont le diamètre est inférieur à 200nm et dont la charge globale est positive (voir Figure 24). Les rapports entre les lipides et lipide / ADN, tout comme la méthode de préparation ont été optimisées pour obtenir le maximum d'efficacité de transfection *in vitro*, même en présence de protéines sériques, puis *in vivo* (Thierry *et al.* 1997a, 1997b). Le procédé d'obtention des particules complexes DLS / ADN par injection à l'éthanol a été breveté en 1995 (WO96/03977).

**Figure 24** : images de cryo-microscopie électronique de particules DLS (à gauche) et de complexes DLS-ADNp (à droite). D'après Thierry (en préparation).



La formation de complexes peut être mise en évidence par l'aspect plus opalescent des particules en comparaison avec les SUV non complexés (voir Figure 25). Les particules formées sont ainsi capables de dévier la lumière, d'où leur aspect opalescent.

**Figure 25 : particules de DLS (à gauche) et de DLS-ON (à droite).**



Dans des expériences *in vivo* chez la souris (Thierry *et al.* 1995), la délivrance d'AN par les DLS a montré une expression à long terme du transgène (jusqu'à 3 mois après injection) pour la 1<sup>ère</sup> fois avec un vecteur synthétique. Cette expression s'avère dépendante du promoteur plasmidique utilisé, de la dose d'ADN injectée et de la voie d'administration (Aksentjevish *et al.* 1996, Thierry *et al.* 1995). L'expression du transgène a ainsi été mise en évidence principalement dans les poumons, le foie, les reins et le coeur. Ces liposomes ont aussi montré une efficacité de transfection *in vitro* supérieure à certains lipides commerciaux comme le Transfectame seul (Promega), la Lipofectine (LF, Invitrogen) ou la Lipofectamine (LFA, Invitrogen), en présence ou non de sérum (Thierry *et al.* 1997).

De nombreux travaux avec les DLS / ADN plasmidique (ADNp) ont été menés dans diverses stratégies thérapeutiques : transfert du gène *mdr-1* (MultiDrug Resistance) dans les cellules progénitrices de la moelle osseuse chez la souris (Aksentjevish *et al.* 1996, Baudard *et al.* 1996), transfert *in vivo* du gène *hcg* de la glucocérebrosidase humaine (Baudard *et al.* 1996). D'autres travaux ont été menés avec des complexes DLS / ON : utilisation d'ASO pour inhiber la réplication du HIV-1 (Lavigne *et al.* 1997, 2001, 2002), transfert du gène du facteur IX chez la souris (Takle *et al.* 1997), inhibition de la tumorigénicité du sarcome de Kaposi (Samaniego *et al.* 1999, Lavigne *et al.* 2004).

#### *b. Les Neutraplex.*

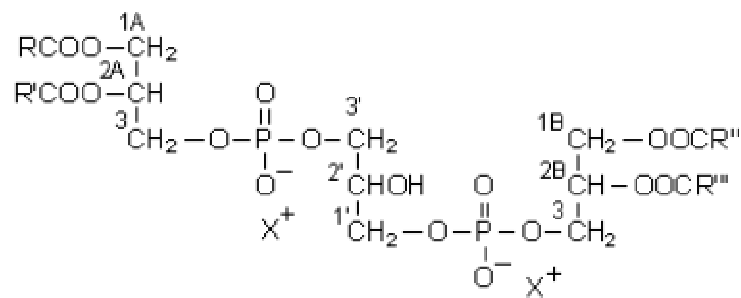
L'approche lipoplexe s'est montrée efficace pour le transport d'ADN plasmidique *in vitro*. L'application clinique semble plus difficile à cause de la toxicité engendrée par le caractère globalement cationique des complexes (Thierry *et al.* 1998). De plus, les particules positives se lient rapidement avec des particules globalement négatives, comme les protéines sériques circulantes, ce qui conduit à leur inactivation *in vivo*.



La difficulté à formuler des complexes globalement négatifs ou proches de la neutralité est liée à des problèmes galéniques de formulation. En effet, les réactions mises en jeu lors de la formation des lipoplexes impliquent la formation de liaisons électrostatiques entre des constituants polyanioniques difficiles à maîtriser.

Le Neutraplex (Nx), dérivé des DLS, est basé sur la préparation de complexes stables liposomes / ADN de charge globale négative ou avoisinant la neutralité. Cette caractéristique permet d'amoindrir les barrières pharmacologiques et physiologiques. Un lipide, la cardiolipine (CL) de type diphosphatidylglycérol (voir Figure 26), est ajouté à la préparation de base des DLS ; c'est un phospholipide chargé négativement présent dans la membrane bactérienne ainsi que dans la paroi mitochondriale interne.

**Figure 26 : structure de la cardiolipine.**

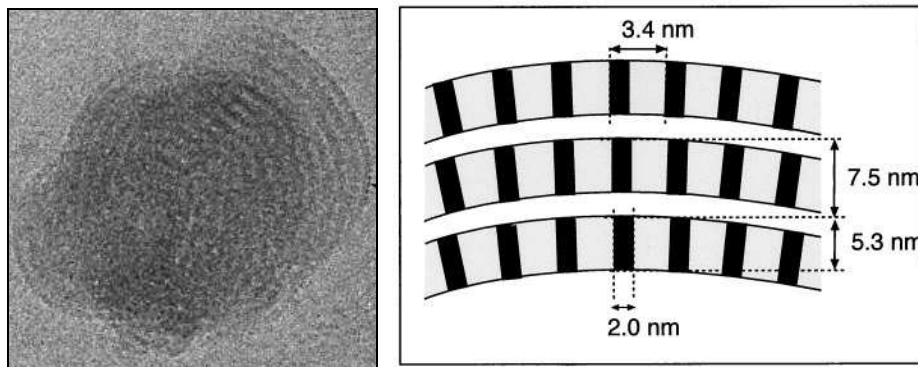


Comme pour les DLS, un excès d'eau permet la formation de particules de type SUV. Cette formulation a donné lieu à un dépôt de brevet en 1997 (WO99/06026). C'est à ce jour le seul système permettant d'obtenir des complexes globalement positifs, proches de la neutralité ou négatifs, en fonction de la quantité d'AN au sein de la formulation. Une étude de pharmacocinétique et de PET (Tomographie par Emission de Positons) a mis en évidence une biodistribution de l'ADN principalement dans le foie, les poumons, le cœur, la rate, les reins et les muscles. La disponibilité de l'AN est ainsi améliorée par rapport à l'utilisation de vecteurs synthétiques cationiques conventionnels (Tavitian *et al.* 2002).

L'analyse des Nx en cryo-microscopie électronique et SAXS (analyse au rayon X à petits angles) à partir d'ADNp, a montré des particules multilamellaires (une dizaine de couches) et sphériques, présentant une organisation concentrique, avec un espacement répétitif et une nature de cristal liquide (voir Figure 27). Il a aussi été mis en évidence la

présence de phases lamellaires et hexagonales, parfois coexistantes au sein des mêmes particules de Nx. Cette structure a été observée pour tous les AN testés (circulaire, linéaire, simple brin, double brin) (Schmutz *et al.* 1999).

**Figure 27** : à gauche, image de cryo-microscopie électronique d'une particule multilamellaire de Nx-ADNp. A droite, schéma réalisé à partir des observations en cryo-microscopie électronique, d'une portion de Nx-ADNp. D'après Schmutz *et al.* 1999.



La délivrance d'ON par les DLS et les Neutraplex n'a cependant pas été optimisée. Le but de mon projet de thèse est justement de développer et d'optimiser la délivrance d'ASO (ADN et ARN simple brin) et de siRNA (ARN double brin) à visée thérapeutique, appliqués respectivement à la correction de l'épissage alternatif et au cancer du sein.

## 2) Application aux ON antisens : correction de l'épissage alternatif anormal.

### a. *La $\beta$ -thalassémie.*

Les thalassémies sont un groupe de maladies congénitales caractérisées par une anomalie de synthèse des chaînes de globines, les composantes de l'hémoglobine. L'hémoglobine normale adulte est composée à 97% d'hémoglobine A (2 chaînes  $\alpha$  et 2 chaînes  $\beta$ ), 2-3% d'hémoglobine A2 (2 chaînes  $\alpha$  et 2 chaînes  $\beta$ ) et moins de 1% d'hémoglobine fœtale (2 chaînes  $\alpha$  et 2 chaînes  $\beta$ ). Les  $\beta$ -thalassémies sont dues à un déficit de synthèse de la chaîne  $\beta$ . La plupart des hémoglobines anormales n'ont pas d'expression clinique. Les thalassémies sont les maladies génétiques les plus fréquentes, de répartition mondiale. La fréquence de la  $\beta$ -thalassémie est maximale au niveau de la région méditerranéenne (d'où le nom d'anémie méditerranéenne), du Moyen-Orient, du Sud-Est asiatique et des populations migrantes et ethnies originaires de ces régions (Schwartz *et al.* 1988).

La plupart des hémoglobinopathies sont liées à des mutations, généralement responsables de la substitution d'un acide aminé par un autre. La variabilité des anomalies biochimiques est responsable de la variabilité des expressions cliniques :

- **$\beta$ -thalassémie majeure (forme homozygote) ou anémie de Cooley.** L'excès de production des chaînes  $\alpha$  entraîne leur précipitation. Ces précipités sont toxiques pour les érythroblastes, d'où une anémie précoce survenant généralement dès l'âge de 3 mois. Cette anémie entraîne une hypersécrétion d'érythropoïétine et la prolifération massive de la moelle osseuse : fractures, déformation des os du crâne, compressions médullaires... Il existe également un retard de croissance, une puberté retardée souvent incomplète, qui s'accompagne d'une cardiomégalie et d'une hépatosplénomégalie. Non traitée, la maladie est mortelle avant 4 ans. Pour les formes les plus sévères, une transfusion de globules rouges est nécessaire environ une fois par mois. Ce traitement transfusionnel permet de maintenir un taux d'hémoglobine aux alentours de 12 g/l et évite l'apparition des signes cliniques. Les greffes de moelle sont toutefois possibles, avec cependant des risques de mortalité post-greffe. Aux transfusions s'ajoute un traitement à base de chélateurs de fer. Les enfants régulièrement transfusés grandissent normalement mais sont atteints dès la 2<sup>ème</sup> décennie de troubles cardiaques et endocriniens, ainsi qu'une fibrose hépatique pouvant se transformer en cirrhose. Non prévenus, ces symptômes peuvent provoquer au décès avant 30 ans.

- **$\beta$ -thalassémie intermédiaire** : anémie spontanée. Les sujets homozygotes ont une expression résiduelle plus importante des chaînes  $\beta$ . Symptômes : retentissement plus modéré sur l'état général, splénomégalie, hémochromatose secondaire, ulcères de jambe.

- **$\beta$ -thalassémie mineure (forme hétérozygote)** : fréquence très diminuée des complications qui peuvent cependant survenir.

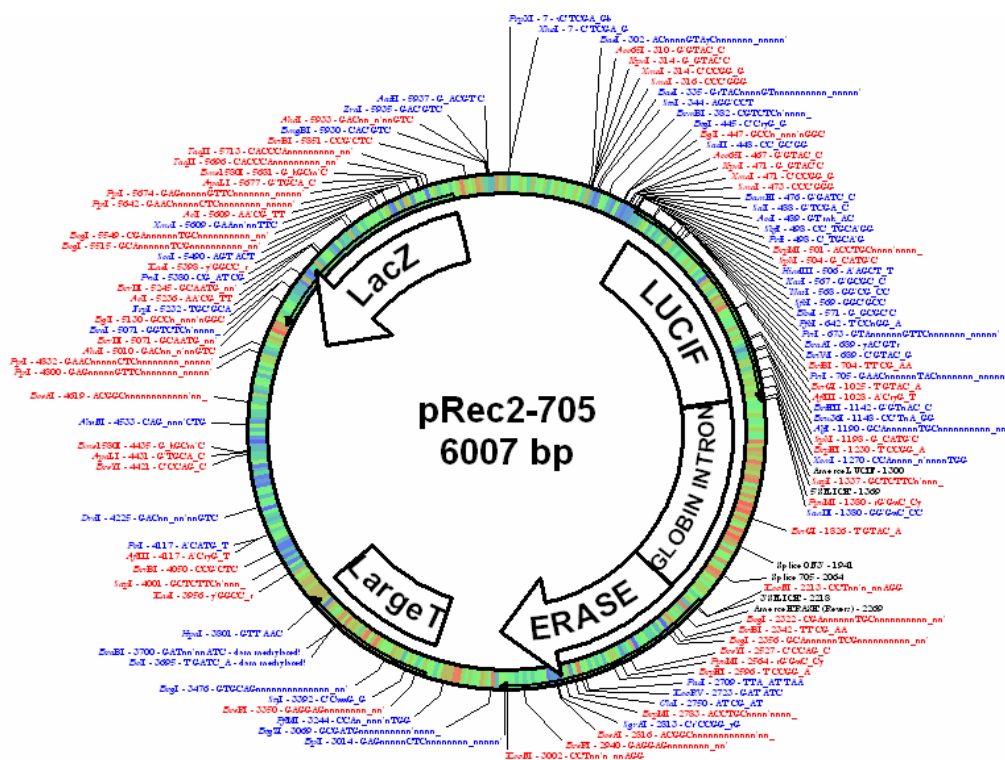
- **$\beta$ -thalassémie silencieuse** : forme hétérozygote sans expression clinique.

#### b. *Le modèle de Ryszard Kole.*

Le gène de la  $\beta$ -thalassémie est porté par le chromosome 11 chez l'homme. Le gène est composé de 3 introns et de 2 introns aberrants qui présentent plus de 200 mutations différentes identifiées dues à la substitution, l'insertion ou la délétion d'un nucléotide, mais seulement 10 seraient responsables de 90% des cas de la maladie (Huisman *et al.* 1997, Lacera *et al.* 2000). Il en résulte un site cryptique de l'épissage alternatif, à l'origine de la conservation d'un morceau d'intron et donc d'un épissage anormal et incomplet (Olivieri *et al.* 1999).

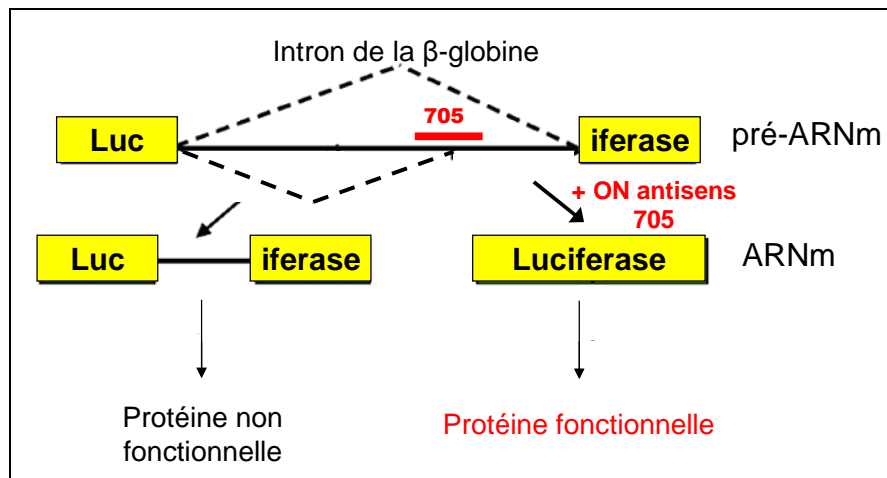
A partir de l'intron aberrant  $\beta$ -thalassémique, R. Kole et collaborateurs (Kang *et al.* 1998) ont proposé un modèle pour corriger cet épissage anormal. Dans un plasmide, l'intron aberrant de la  $\beta$ -globine a été inséré entre 2 exons d'un gène rapporteur, ici la luciférase. Ce plasmide appelé pLuc705 ou pRec2-705 (voir Figure 28), a été transfecté de manière stable dans des cellules HeLa. Ce plasmide comporte un promoteur fort de type CMV (CytoMégaloVirus).

**Figure 28 : carte du plasmide pRec2-705.**



L'hybridation de l'ASO correcteur au niveau de la mutation (ici en position 705) masque le site cryptique et réoriente l'épissage vers le site accepteur le plus proche ; la protéine fonctionnelle est alors synthétisée (voir Figure 29).

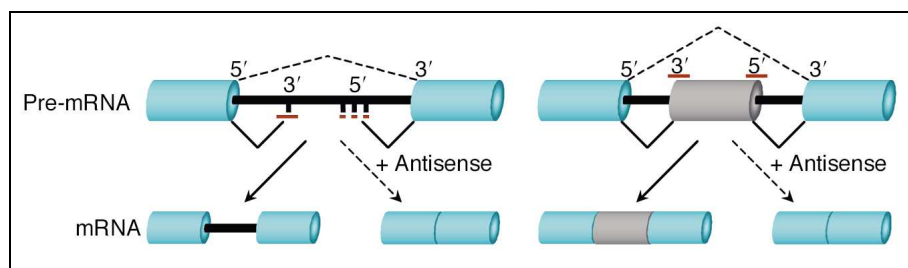
**Figure 29 : modèle de correction de l'épissage alternatif avec des ASO.**  
D'après Kang et al. 1998.



Contrairement à l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), la luciférase présente très peu de bruit de fond et n'est pas synthétisée naturellement par les cellules de mammifères. Ce système nous permet donc d'évaluer l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de vectorisation des ASO jusqu'au noyau, lieu de l'épissage alternatif. Un signal positif facilement quantifiable par mesure de la luminescence est obtenu.

De la même façon, l'utilisation d'ASO peut induire un saut d'exon, comme dans le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne, de la progéria et de la mucoviscidose pour la mutation CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) (voir Figure 30).

**Figure 30 : comparaison entre les systèmes de correction de l'épissage alternatif (à gauche) et de saut d'exon (à droite).** D'après Sazani et al. 2003).



L'identification de mutations dans les séquences nécessaires à l'épissage ou à son contrôle a permis de déterminer les modifications d'épissage en relation avec le développement de maladies héréditaires ou cancéreuses : 9.5% des mutations répertoriées dans HGMD (Human Gene Mutation Database) affecteraient l'épissage (Corcos et al. 2005,

Sazani *et al.* 2003). D'autres mutations de ce type ont été identifiées et sont à l'origine de maladies génétiques, de cancers et de pathologies neurologiques (Mercatante *et al.* 2001, 2002).

En effet, on estime qu'environ 15% des mutations à l'origine de maladies génétiques seraient dues à un l'épissage alternatif déficient du pré-ARNm (Krawezak *et al.* 1992) et qu'environ 50% des maladies génétiques sont dues à des mutations qui causent des dysfonctionnement de l'épissage alternatif (Sazani *et al.* 2003). Certains troubles neurologiques seraient aussi associés à une déficience de l'épissage alternatif. Enfin, il existe de nombreux exemples dans des cas de cancers (carcinome hépatocellulaire, cancer de la prostate, du sein, de l'ovaire, myélome multiple, tumeur gastro-intestinale) où les altérations de l'épissage alternatif sont liées à des mutations qui créent ou éliminent des sites d'épissage, comme des sites activateurs ou suppresseurs (Srebrow *et al.* 2006, Brinkman *et al.* 2004, Venables *et al.* 2006).

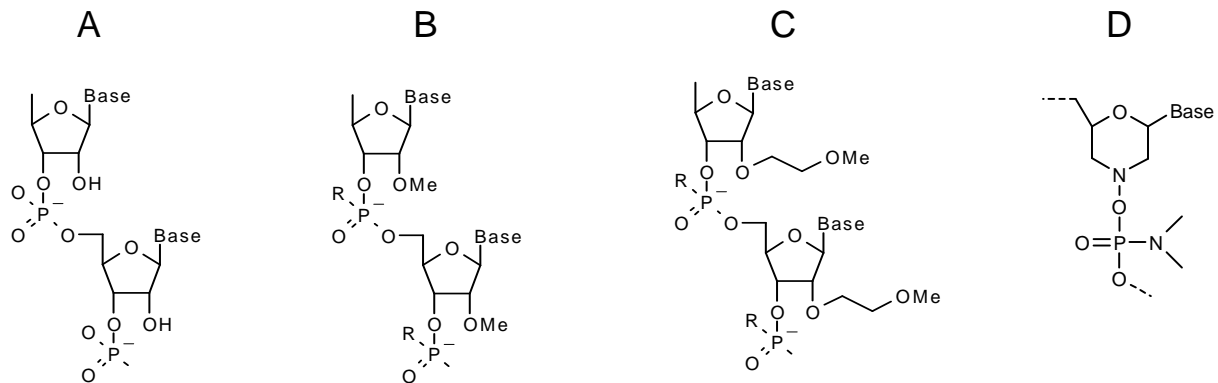
Les applications pour réparer un épissage défectueux, détourner un épissage différentiel, ou imposer un saut d'exon avec des ASO vectorisés sont donc nombreuses.

### *c. Les oligonucléotides modifiés.*

Dans ce système, les ON doivent être stables en présence de sérum, s'hybrider avec une affinité élevée, être résistants aux nucléases et pouvoir entrer dans le noyau des cellules, lieu de l'épissage alternatif des pré-ARNm (Thierry *et al.* 2003). Les ON simple brin et non modifiés, s'hybrident sur le pré-ARNm et recrutent la RNase H. Pour corriger l'épissage alternatif anormal, les ASO ne doivent donc pas être reconnus par la RNase H.

Des ON de 18 mers ont été modifiés chimiquement, au niveau de leurs sucres, des liaisons inter-nucléotidiques et des bases nucléotidiques (voir Figure 31) : 2'-O-méthyl (2'-O-Me) avec un squelette phosphorothioate (PS) ou non, 2'-O-méthoxyéthyl-phosphorothioate (MOE), phosphorodiamidate morpholino oligomères (PMO). Ces ON ont été appliqués à la correction d'épissage (Furdon *et al.* 1989, Mercatante *et al.* 2001, Sazani *et al.* 2001, 2002). Récemment de nouvelles chimies intéressantes d'oligomères ont été proposées pour corriger l'épissage alternatif *in vitro* et *in vivo* : c'est le cas des LNA (Roberts *et al.* 2006).

**Figure 31** : structures chimiques de divers ON utilisés pour corriger l'épissage alternatif déficient. A : ARN. B : 2'O-Me. C : MOE. D : PMO. Adapté de Resina et al. 2007b.



Il en résulte des ON plus stables dans les milieux biologiques (présence de protéines sériques), stables au niveau de l'hybridation sur le pré-ARNm et résistants aux nucléases. Par conséquent, ces ON modifiés corrigent mieux l'épissage alternatif anormal. Ces ASO s'hybrident et masquent la mutation spécifiquement, par encombrement stérique, d'où leur appellation de « steric-block ON ». Cependant, ils demandent toujours à être délivrés via des vecteurs pour pouvoir traverser la membrane plasmique, car ils pénètrent très peu seuls (Remaut *et al.* 2006).

### 3) Application aux siRNA : inhibition de PAI-1 dans le contexte d'une approche anticancéreuse.

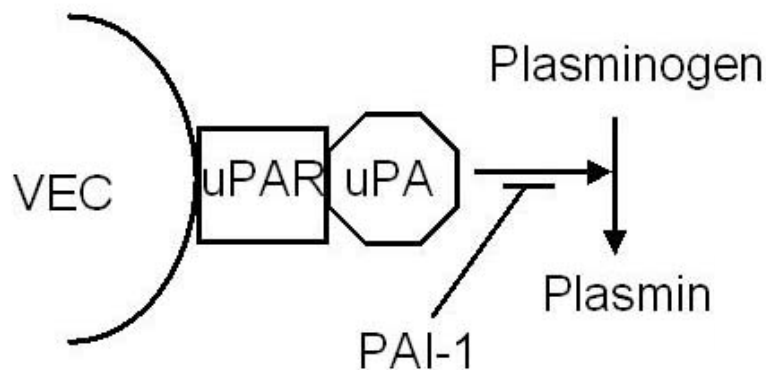
#### a. *Le système PAs.*

Au niveau cellulaire, 3 partenaires constituent le système activateur du plasminogène (PAs). L'activateur du plasminogène appelé urokinase (uPA) est l'enzyme capable de transformer le plasminogène en plasmine. Cette enzyme se lie à un récepteur membranaire spécifique, le récepteur de l'urokinase (uPAR).

Le 3<sup>ème</sup> partenaire du système PAs est l'inhibiteur de l'urokinase de type 1 (PAI-1). PAI-1 est une glycoprotéine de 50kDa, de la superfamille des inhibiteurs de sérine protéase (SERPIN), le principal inhibiteur du PAs et activateur de l'uPA ainsi que du tPA (tissue type). Il est sécrété sous une forme active qui est convertie spontanément en une forme latente, mais il peut se stabiliser sous une forme active en se liant à la vitronectine plasmatique.

Sous sa forme soluble, PAI-1 se lie à l'uPA, elle-même fixée à son récepteur membranaire, l'uPAR. Cette interaction aboutit à l'arrêt de la protéolyse péricellulaire dépendante de l'uPA. La fixation de PAI-1 conduit à l'endocytose du complexe uPAR–uPA–PAI-1 par le biais d'un récepteur spécifique de l'internalisation. Le complexe uPA-PAI-1 est dégradé tandis que le récepteur uPAR est recyclé à la membrane.

**Figure 32 : système PAs.**  
VEC : cellule endothéliale vasculaire.



Des études suggèrent que PAI-1 est impliqué *in vitro* dans :

- l'adhésion cellulaire (Chazaud *et al.* 2000, 2002)
- la réorganisation du cytosquelette d'actine, le complexe (uPAR–uPA–PAI-1) permettant d'augmenter la rigidité du cytosquelette (Wang *et al.* 1995)
- le changement de morphologie des cellules (Malo *et al.* 2006, Marquetot 2006)
- l'angiogénèse (Bajou *et al.* 2002)
- la migration cellulaire, en la favorisant ou en la défavorisant (Chazaud *et al.* 2002, Walt *et al.* 1997, Lazar *et al.* 2004, Czekay *et al.* 2004, Wang *et al.* 2005)
- le processus cancéreux (Bajou *et al.* 1998, Duffy *et al.* 2004, Umeda *et al.* 1997).

#### *b. Implication de PAI-1 dans la migration cellulaire.*

Sous sa forme associée à la matrice, on parle alors de PAI-1 matriciel, PAI-1 est lié principalement à la vitronectine. Lorsque le complexe tripartite (uPAR–uPA–PAI-1) se forme avec le PAI-1 matriciel, il constitue alors un pont moléculaire liant la cellule à la matrice extracellulaire. *In vitro*, le PAI-1 matriciel module les interactions entre la cellule et la matrice au cours de la migration cellulaire et plus particulièrement lors des processus d'adhésion et de mobilité (Bonavaud *et al.* 1997, Planus *et al.* 1997, Chazaud *et al.* 2000, 2002).



Le processus de migration cellulaire requiert une séquence répétée de phases d'adhérence, d'ancrage, de dé-adhérence, ainsi que la translocation de la cellule. Ce processus implique, dans le cas de cellules adhérentes, des interactions complexes entre la membrane et la matrice extracellulaire, la réorganisation du cytosquelette et la mise en œuvre de moteurs moléculaires. PAI-1 paraît être un important régulateur de l'homéostasie vasculaire. Par exemple, les plaques d'athérosclérose humaines expriment PAI-1 et des niveaux élevés de cet inhibiteur sont associés avec l'athérosclérose coronarienne. Dans le but de supprimer l'expression de PAI-1, en collaboration avec une équipe de Goettingen, notre laboratoire a démontré le blocage de l'expression du gène de PAI-1 dans des cellules endothéliales vasculaires humaines à l'aide de siRNA (Hecke *et al.* 2006).

*c. Implication de PAI-1 dans l'angiogénèse tumorale.*

Les tumeurs et les capillaires endothéliaux expriment de plus hauts taux de PAI-1 que les autres types cellulaires (Bajou *et al.* 1998). De ce fait, PAI-1 pourrait servir de protection pour le stroma de la tumeur contre la dégradation par de forts taux d'uPA.

Durant l'angiogénèse, les cellules endothéliales utilisent le système activateur du plasminogène et PAI-1 pour migrer puis dégrader la membrane basale entourant les vaisseaux capillaires sanguins. Les cellules tumorales invasives produisent une grande quantité de uPA qui pourrait se lier avec le récepteur membranaire spécifique uPAR présent à la surface des cellules endothéliales pour faciliter leur invasion. Il a été démontré que les interactions existant entre les cellules tumorales du cancer du sein et les cellules endothéliales peuvent moduler l'angiogénèse tumorale au moins par 2 mécanismes : une augmentation de la liaison à la surface des cellules de uPA et PAI-1 et leur expression dans les cellules endothéliales (Bajou *et al.* 2002). PAI-1 participerait donc à induire l'angiogénèse tumorale.

Plusieurs études ont montré un fort taux de PAI-1 dans le cytosol ou le lysat de nombreuses tumeurs invasives : cancer du sein (Chazaud *et al.* 2002, Grondahl-Hansen *et al.* 1993, Janicke *et al.* 1994, Foekens *et al.* 1994, Reilly *et al.* 1992, Tsuchiya *et al.* 1997), des poumons (Pedersen *et al.* 1994), du colon (Miseljic *et al.* 1995, Nielsen *et al.* 1998), carcinome rénal (Wagner *et al.* 1996). D'une manière générale, il apparaît une corrélation entre le niveau élevé d'expression de PAI-1 et le mauvais pronostic de cancer, du sein en particulier (Grondahl-Hansen *et al.* 1997). Le système d'activation du plasminogène est un

système protéolytique impliqué dans la migration de nombreuses cellules, mais plus particulièrement dans celle des cellules cancéreuses. PAI-1 apparaît ainsi comme une molécule «promigratoire». L'hypothèse de certains chercheurs est qu'il représente un facteur clé susceptible de déclencher le comportement métastatique (Delaplace *et al.* 2004, Chazaud *et al.* 2002, Malo *et al.* 2006).

## **CHAPITRE 3 : RÉSULTATS**

## **ARTICLE I**

**« Comparaison de la vectorisation d'oligonucléotides corrigeant  
l'épissage à l'aide de peptides et de lipides »**

Biochimica et Biophysica Acta

Volume **1758**(3):364-374, 2006

## I. INTRODUCTION.

Notre laboratoire a la chance de développer simultanément 2 approches de vectorisation pour les ON : l'utilisation de peptides et de lipides cationiques. Le modèle de correction de l'épissage alternatif, contenant l'intron 2 de la  $\beta$ -globine et dont le gène rapporteur est la luciférase (Kang *et al.* 1998), nous a permis d'évaluer l'efficacité de vectorisation des ON *in vitro*, pour une stratégie antisens. L'efficacité de vectorisation des CPP (TAT-PNA, K<sub>8</sub>-PNA) a été comparée à celle des lipides cationiques (LFA, DLS). Cette technique d'analyse est intéressante car elle s'affranchit d'interférences avec la toxicité des produits, contrairement à la stratégie antisens classique. En effet, la correction de l'épissage induit un signal positif, directement liée à l'efficacité de vectorisation des ON jusqu'au noyau. Le test est basé sur le fait que plus les ON antisens corrigent l'épissage au niveau du pré-ARNm dans le noyau, et plus la quantité de protéine luciférase mesurée sera élevée.

Les PNA utilisés sont conjugués à une séquence d'ON correcteur de 18 mers. Dans la stratégie basée sur l'utilisation de lipides cationiques, des ON de type 2'O-Me ont été complexés aux DLS ou à la LFA (Invitrogen). Dans tous les cas, les ON utilisés n'activent pas la RNase H, ce qui est nécessaire pour ce modèle.

Il existe plusieurs techniques pour quantifier ou qualifier la pénétration des ON et leur activité :

- ◆ luminométrie : mesure de la protéine luciférase présente dans le cytoplasme des cellules (quantitatif),
- ◆ RT-PCR : observation de l'ARNm luciférase présent dans le noyau et le cytoplasme des cellules (qualitatif),
- ◆ microscopie : observation des ON fluorescents (FITC, Alexa<sub>546</sub>) pénétrés dans la cellule (qualitatif),
- ◆ cytométrie en flux (FACS) : mesure de la fluorescence des ON à la surface et présents dans le noyau et le cytoplasme des cellules (quantitatif).

Sans correction de l'épissage, l'ARNm synthétisé contient toujours un fragment d'intron et ne peut être à l'origine d'une protéine fonctionnelle. En présence des ON antisens, l'épissage s'effectue normalement et l'ARNm produit sera à l'origine de la synthèse d'une protéine luciférase fonctionnelle. Les 2 ARNm, aberrant et corrigé, se distinguent par leur taille : 268 et 142 nucléotides, respectivement. A cause de la faible différence des 2 ARNm

synthétisés, la RT-PCR quantitative, aussi appelée PCR en temps réel, ne peut être appliquée à ce modèle. De ce fait, l'analyse des ARNm par RT-PCR ne peut être que qualitative.

Les ON<sub>705</sub> antisens utilisés ont été conçus pour s'hybrider parfaitement au niveau de la mutation en position 705 de l'intron  $\beta$ -thalassémique de l'ARNm de la luciférase. Comme contrôle de spécificité, une version brouillée de l'ON<sub>705</sub> a été déterminée, appelée SC (scrambled).

## II. CONTRIBUTION.

Dans cet article visant à comparer les 2 types de vecteurs, lipides cationiques et peptides, j'ai réalisé les expériences de correction de l'épissage (Figure 4) avec les lipoplexes DLS-ON que j'ai formulés. Les essais concernant les peptides ont été effectués par le doctorant de l'équipe travaillant avec les vecteurs peptidiques, Saïd ABES. Les expériences de microscopie ont été réalisées par un étudiant stagiaire et par Paul PREVOT, le spécialiste de la microscopie à épifluorescence de l'équipe.

## III. CONCLUSION.

### ◆ Les peptides.

Les PNA<sub>705</sub> libres et les K<sub>8</sub>-PNA utilisés à forte concentration (1 à 2 $\mu$ M) corrigent très peu l'épissage *in vitro* dans le modèle de R. Kole. En effet, ces peptides sont séquestrés dans les vésicules des endosomes, comme le montre les images obtenues par microscopie de fluorescence. Seule une partie infime et non détectable de peptides se retrouve dans le noyau. L'ajout d'un agent endosomolytique comme la chloroquine, libère les peptides et permet la correction de l'épissage des K<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub> mais pas des K<sub>8</sub>-PNA<sub>SC</sub>, ni des PNA<sub>705</sub> libres. Cette correction est donc séquence-spécifique pour les CPP. Par contre, ils permettent de délivrer des ON neutres de 3<sup>ème</sup> génération comme les PNA ou les PMO, ce qui n'est pas possible pour les lipides cationiques.

### ◆ Les lipides cationiques.

Même en absence de sérum, les DLS-ON<sub>705</sub> corrigent 2.5 fois mieux l'épissage que la LFA-ON<sub>705</sub>. Cette correction est aussi séquence-spécifique. D'autre part, la correction d'épissage est significative à partir de 1nM d'ON, ce qui est très peu par rapport aux concentrations utilisées dans la littérature ( $\geq$  100nM). Les DLS permettent une protection et une délivrance efficace des ON dans la cellule. La vectorisation par le système DLS est donc

efficace dans ce modèle. Par contre, de par leur charge cationique, ils s'avèrent cytotoxiques dès 300nM d'ON délivrés en milieu sans sérum et pour une transfection de 24h.

◆ Peptides versus lipides cationiques.

Les peptides testés sont donc limités d'une part par leur séquestration dans les endosomes contrairement aux lipides cationiques et d'autre part, par une activité inférieure à celle des DLS. De ce fait, les DLS paraissent plus appropriés que TAT-PNA et K<sub>8</sub>-PNA pour corriger l'épissage alternatif des cellules HeLa pLuc705 *in vitro*. La synthèse de nouveaux conjugués peptidiques originaux paraît donc nécessaires, afin de bénéficier de leurs avantages pharmaceutiques en terme de synthèse et de stabilité.

**IV. ARTICLE I.**

**Comparison of basic peptides- and lipid-based strategies for the delivery of splice correcting oligonucleotides.**

Thierry A.R., Abes S., Resina S., Travo A., Richard J.-P., Prevot P. and Lebleu B.

*Biochimica Biophysica Acta*, 2006;**1758**(3):364-374.

Review

# Comparison of basic peptides- and lipid-based strategies for the delivery of splice correcting oligonucleotides

Alain R. Thierry, Said Abes, Sarah Resina, Adrian Travo, Jean Philippe Richard<sup>1</sup>,  
Paul Prevot, Bernard Lebleu\*

UMR 5124 CNRS, CC 086, Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France

Received 14 September 2005; received in revised form 24 October 2005; accepted 24 October 2005

Available online 18 November 2005

## Abstract

Expression of alternatively spliced mRNA variants at specific stages of development or in specific cells and tissues contributes to the functional diversity of the human genome. Aberrations in alternative splicing were found as a cause or a contributing factor to the development, progression, or maintenance of numerous diseases. The use of antisense oligonucleotides (ON) to modify aberrant expression patterns of alternatively spliced mRNAs is a novel means of potentially controlling such diseases. Oligonucleotides can be designed to repair genetic mutations, to modify genomic sequences in order to compensate for gene deletions, or to modify RNA processing in order to improve the effects of the underlying gene mutation. Steric block ON approach have proven to be effective in experimental model for various diseases. Here, we describe our experience in investigating two strategies for ON delivery: ON conjugation with basic peptides and lipid-based particulate system (lipoplex). Basic peptides or Cell Penetrating Peptides (CPP) such as the TAT-derived peptide appear to circumvent many problems associated with ON and drug delivery. This strategy may represent the next paradigm in our ability to modulate cell function and offers a unique avenue for the treatment of disease. Lipoplexes result from the intimate interaction of ON with cationic lipids leading to ON carrying particles able to be taken up by cells and to release ON in the cytoplasm. We have used as an experimental model the correction of a splicing alteration of the mutated  $\beta$ -globin intron causing thalassemia. Data on cell penetration and efficacy of correction of specific steric block ON delivered either by basic peptides or lipoplex are described. A comparison of the properties of both delivery systems is made respective to the use of this new class of therapeutic molecules.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Antisense oligonucleotide; PNA; Delivery; Cell penetrating peptide; Liposome; Splicing correction

## Contents

1. Steric-block oligonucleotides as tools for splicing modulation and for aberrant splicing correction. . . . .	365
2. Requirements for efficient splicing correction by steric-block oligonucleotides . . . . .	365
3. Present status with the delivery of steric block oligonucleotides . . . . .	366
4. Our experience with delivery strategies . . . . .	367
4.1. ON delivery via Tat peptide conjugation . . . . .	367
4.2. Lipoplexes . . . . .	368
5. Basic peptides and lipoplexes for the delivery of splice correcting oligonucleotides . . . . .	369
5.1. Use of DLS lipoplex for delivering steric block ON in Kole's model . . . . .	369
5.2. Use of basic peptides for delivering steric blocking ODN in Kole's model . . . . .	370
6. Future directions. . . . .	372

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 16 33 03; fax: +33 4 67 16 33 01.

Email-address: [blebleu@univ-montp2.fr](mailto:blebleu@univ-montp2.fr) (B. Lebleu).

<sup>1</sup> Present address: NIH, Bldg. 10/Rm. 10D04, 10 Center Drive, Bethesda, MD 20892-1855, USA.



Acknowledgments . . . . .	373
References . . . . .	373

## 1. Steric-block oligonucleotides as tools for splicing modulation and for aberrant splicing correction

Conservative estimates suggest that over 75% of all pre-mRNAs are spliced to yield alternative variants, the translated products of which may have very different functions (review in [1]). How the cell decides which alternative splice site to utilize is not fully understood. However, it is generally believed that splice site selection is controlled by the binding of trans-acting protein factors to cis-acting sequences within pre mRNA during spliceosome assembly. Aberrant splicing can result in deleterious consequences for the organism. In fact, approximately 15% of all mutations that cause genetic diseases result in defective splicing of pre-mRNA. For example, aberrant pre-mRNA splicing occurs in genetic diseases such as  $\beta$ -thalassemia, cystic fibrosis, neurofibromatosis type 1, ataxia-telangiectasia, and congenital lipoid adrenal hyperplasia, Alzheimer disease, myotonic dystrophy, and several cancers [2].

The potential of sequence-specific recognition between complementary nucleic acid sequences (Watson–Crick base pairing) to control gene expression was first exploited over two decades ago and has since been used in basic (e.g., as a tool to assess gene function) and applied (e.g., to downregulate the expression of genes causing human diseases) research. The paradigm of the antisense strategy relies upon the hybridization of a small single-stranded DNA fragment to a complementary mRNA (or viral genomic RNA) target sequence, leading to the inactivation of the latter by steric blockade or by RNase H activation. Antisense approaches have been widely applied for target validation or therapeutic purposes, and approximately 25 phase II/III clinical trials using these approaches are now in progress (review in [3]). Catalytic RNA (ribozymes) and DNA (DNAzymes) are also being considered as tools for the specific degradation of an RNA target [4]. More recently, small interfering RNAs (siRNAs) have shown great potential to specifically trigger the destruction of an RNA target (review in [5]). Finally, synthetic DNA or RNA fragments can be used to compete for DNA- (transcription factors) or RNA-binding proteins, respectively, in the decoy approach [6]. New and increased attention has recently focused on antisense compounds as a tool for correcting mutation leading to splicing alteration [2].

To control pre-mRNA splicing patterns, antisense ON must hybridize with specific splice sites and block spliceosome assembly at the targeted splice site. This, because of the flexibility of splicing machinery, does not result in total inhibition of splicing, but in a shift of the spliceosome to another splice site. As a consequence, an alternative splicing pattern is established or a normally used alternative splice site is used with increased efficiency. It has been shown in this and other laboratories that antisense ON modify the splicing

patterns of pre-mRNAs that harbor aberrant splice sites or aberrant sequence elements involved in splicing [2]. For example, antisense ON have been used to restore correct pre-mRNA splicing patterns of  $\beta$ -globin in  $\beta$ -thalassemia and cystic fibrosis transmembrane receptor (CFTR) in cystic fibrosis [2]. Antisense ON have also been used to induce an alternative splicing pattern in a dystrophin pre-mRNA in Duchenne's muscular dystrophy and to affect the level of expression of Bcl-x splice variants in cancer cells (reviewed in [7]).

It therefore seems that manipulating the splicing pattern of pre-mRNAs can be effective as a means to control a variety of diseases.

## 2. Requirements for efficient splicing correction by steric-block oligonucleotides

Implementation of antisense strategies has faced a number of problems (some unforeseen) such as nuclease sensitivity, target accessibility, target affinity, toxicity and delivery. Numerous ON analogs have been designed in order to improve target affinity and metabolic stability in a biological environment. Another frequently encountered drawback is the difficulty of distinguishing an authentic antisense effect from non-specific or toxic effects [8]. Steric block antisense for splicing correction and siRNA are new classes of ON with higher specificity, stability and consequently with higher potential compared with the conventional antisense molecules.

As described in Section 1, splicing correction by the hybridization of steric-block ON analogues (also called splicing-switching ON) to cryptic splice sites has been convincingly documented in several cases. Basic requirements and problems experienced with all nucleic acids-based strategies hold through in this case and will not be reviewed here. To be effective the correcting ON should hybridize the pre-mRNA in a sequence-specific fashion without activating a nuclease. The use of phosphorothioate ON derivatives (whose binding to complementary RNA recruits RNase H) or of siRNA (which trigger the degradation of the target RNA through a RISC complex-associated nuclease) is therefore precluded. RNase H-incompetent ON analogues as charged 2'-Oalkyl ON derivatives, or neutral PMO (Phosphorodiamidate Morpholino Oligonucleotides) and PNA (Peptide Nucleic Acids) analogues have therefore been used in this aim [3]. These analogues have favourable pharmacologic properties in terms of nuclease resistance and affinity for the targeted RNA sequence. High affinity is particularly important since RNaseH incompetent ON analogues will at best act in stoichiometric amounts. Interestingly, RNaseH incompetent ON might be acting more specifically than RNaseH activators. Indeed RNaseH activation by antisense ON hybridized on a few consecutive positions only to the target RNA sequence has

been proposed as a source of non-specific effects. Along the same lines unmethylated DNA stretches and phosphorothioate ON derivatives bind to Toll-like receptors on dendritic cells thereby triggering inflammatory responses in vivo. This has not been reported to our knowledge for PMO and PNA analogues.

Since pre-mRNA maturation takes place in nuclei, the correcting ON should be delivered in this cellular compartment. ON delivery is achievable in cell culture experiments with the physical (scrape loading, electroporation or microinjection) or chemical (formation of complex to commercial cationic lipids or to polyethylene-imine (PEI)) transfection agents, which are commonly used for plasmid DNA delivery (reviewed in [9,10]). Unfortunately, uncharged ON analogues such as PMO or PNA cannot be transfected with cationic lipids or PEI, and unassisted cellular uptake is very poor. Moreover, most commercial cationic lipids formulations are not adapted to systemic in vivo administration [9,11]. New lipoplex formulations [12–14] and peptide-based delivery vehicles (reviewed in [15,16]) with promising properties have been described by our group as detailed in Section 4.

An alternative potential strategy for splicing correction could capitalize on the fact that cis-elements governing alternative splicing often work at a suboptimal level and strictly require recognition by enhancer SR proteins [17]. Downregulation of these trans-acting elements can therefore be envisaged by an siRNA strategy [9]. Again, however, the implementation of in vivo siRNA strategies requires adequate siRNA modification (to improve metabolic stability) and more importantly suitable delivery vectors.

### 3. Present status with the delivery of steric block oligonucleotides

Several approaches were explored in the way in developing steric block ON for correction of splice alterations. In order to demonstrate the proof of principle of this strategy various mechanical methods were used (i) Concentrating PMO (45  $\mu$ M) with cells by repetitive passages through syringe with a 25-gauge needle [18]; (ii), electroporation with 2'-O-methoxyethyl modified ON [19]; (iii), or percutaneous coronary intervention with PMO [20]. Interestingly, PMO delivered by streptolysin O permeabilization (at 20  $\mu$ M in serum-free medium) induced missplicing of *c-myc* mRNA [21].

Polymers forming polyplexes with nucleic acids were used in a few studies. PANAM dendrimers are of interest as they form stable particles in the presence of serum. However, micromolar concentrations were needed and the heterogeneity of particle size will probably preclude systemic injection. The use of triblock copolymer F127 for the intramuscular administration of 2'-O-methyl phosphorothioate antisense ON was described to efficiently restore dystrophic expression in skeletal muscles [22]. Recently, antisense ON have also been used to restore the disrupted reading frame of dystrophin mRNAs in Duchenne muscular dystrophy (DMD). DMD patients suffer from severe muscle degeneration due to frame-disrupting

mutations in the DMD gene that prematurely abort the synthesis of the dystrophin protein [22]. ON-induced restoration of the DMD reading frame is based on inducing the skipping of specific exons. This was successfully applied in cultured muscle cells from DMD patients and in the mdx mouse model [22,23]. High exon skipping levels of up to 90% were achieved, allowing the synthesis of significant levels of dystrophins in over 75% of treated cells. Stable long term expression of antisense ON via AAV administration into skeletal muscle generated sustained therapeutic levels of rescued dystrophin in entire group of muscles [24].

Conjugation with basic peptides was reported to improve significantly the activity of steric block ON. Sazani et al. [25] reported that PNA-4K oligomers (PNA carrying 4 lysine residues) lead to in vitro (30–300 nM) or in vivo (daily i.p. injection of 50 mg/kg in mice) steric block activity in the  $\beta$ -globin Kole's assay (Fig. 1). Abes et al. (in press and section 5) demonstrated that the same PNA-4K was able (at submicromolar concentration) to restore correct  $\beta$ -globin intron splicing in cultured cells but only when endosome-disrupting agents were concurrently administered to cells. Moulton et al. [26] investigated the ability of the Tat-derived CPP (pTat) to deliver PMO into cultured cells. pTAT-PMO conjugate targeted to *c-myc* mRNA downregulated *c-myc* reporter gene expression with an IC<sub>50</sub> of 25  $\mu$ M. pTat appeared to be 7, 5, and 6 times more efficient than three other CPP: pep-1, KFC, and NLS, respectively [26].

Lipoplexes are to date the most employed tools to deliver steric block ON. PMO delivered with the Lipofectin system (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) were active at 100 nM in cultured muscle cells and in vivo following intramuscular administration of 50  $\mu$ g/kg in *mdx* mice [27]. Likewise, splicing correction was achieved with 2'-O-methyl phosphorothioate ON and PMO delivered with the Lipofectamine reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) [18,25]. Those commercially available delivery systems suffer of instability; and serum-free medium is therefore recommended for transfection. In vivo use of lipoplex in delivering steric block ON is, consequently, poorly documented in the literature.

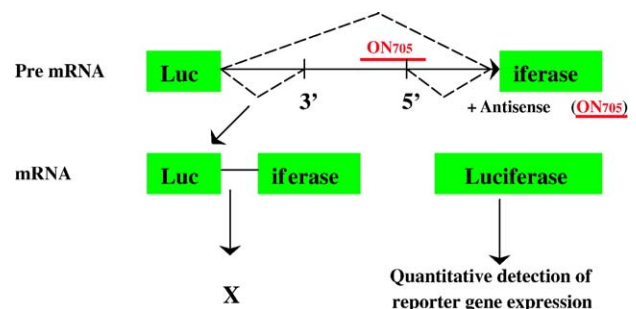


Fig. 1. Splicing correction assay: HeLa pLuc 705 cells were stably transfected with a construction in which the coding sequence of the luciferase gene is interrupted by a mutated intron 2 of the human  $\beta$ -globin gene. This mutation creates a 5' splice site and activates a 3' splice site, leading to the production of an aberrant non-functional protein (X). Masking of the 5' splice site by an RNase H-incompetent antisense ON<sub>705</sub> restores the production of functional luciferase mRNA and protein [2]. Adapted from Kang et al. [50].

#### 4. Our experience with delivery strategies

Delivery within the appropriate intracellular compartments remains a limiting factor for all nucleic acids-based strategies used for the control of gene expression. Endocytosis of free material into most cell types is an inefficient process. Instability in a biological environment and poor cellular uptake are limiting factors in the therapeutic development of ON [28–30]. Appropriate delivery or chemical modification of synthetic ON should, in principle, improve their pharmacological properties through protection from nucleases and by easing their passage through biological barriers. Basically, three strategies are under examination: (i) ON chemical modification, (ii) association with a particulate delivery system, and (iii) conjugation with a hetero-component. We describe below our experience regarding the use of lipoplex-formulated ON and ON-conjugated CPPs.

##### 4.1. ON delivery via Tat peptide conjugation

Much excitement has been generated by the serendipitous discovery by Prochiantz et al. [31] of the transmembrane passage of the *Drosophila* (Antp) protein. Membrane translocation and nuclear delivery has rapidly been assigned to a relatively small (16-mer) basic amino acid-rich peptide belonging to the DNA binding domain of Antp transcription factor [31]. Along the same lines, and to the surprise of virologists, an HIV-1 promoter could be transactivated by incubation of intact cells with the purified Tat protein. An 11-amino acid arginine-rich (GRKKRRQRRRC) peptide belonging to the RNA binding domain of Tat has been defined by our group and shown to be able to cross membranes [32]. Other peptides or peptide-mimics have since been engineered for drug delivery under the generic name of cell penetrating peptides, or CPP. CPPs can be internalized in most cell types and, more importantly, allow the cellular delivery of conjugated (or fused) biomolecules. A wide range of biomolecules such as antigenic peptides, PNA, antisense ON, full-length proteins, or even nanoparticles and liposomes have been delivered this way [15,16]. Most peptide- and nucleic acid-based drugs are poorly taken up in cells, and this is considered a major limitation in their development as therapeutic agents [32]. Conjugation of therapeutic agents to CPPs could thus become a strategy of choice to improve their pharmacological properties.

Langel et al. have provided the key initial data in the field through conjugation of a galanin receptor-specific PNA to transportan, a synthetic CPP [33]. The PNA-transportan complex was delivered within intact neurons in culture and was shown to downregulate the galanin receptor. Most impressively, these same conjugates inhibited galanin receptor expression after injection into mice. PNA delivery into neurons within the brain implied that transportan–PNA conjugates crossed the blood–brain barrier. This may have wide applications in neurobiology and in the treatment of central nervous system-associated diseases [34].

Similarly, a PS-antisense ON conjugated via a disulfide bridge to Antp or Tat peptide has been used to downregulate the expression of the MDR1 gene in cultured cells [15,35]. Although biological responses could be achieved at sub-micromolar concentrations, cationic lipid-mediated delivery is more efficient than the CPP-driven delivery in this assay. Interestingly, the biological response was enhanced in cells cultured in serum-rich medium in contrast to data obtained with cationic lipid-mediated delivery. The low toxicity of CPPs and their effectiveness in the presence of serum appear advantageous for in vivo applications [16]. CPP were initially thought to be internalized by energy-independent translocation through the plasma membrane. We re-evaluated the mechanisms of cellular uptake of TAT 48–60 and (Arg)<sub>9</sub>. Fluorescence microscopy on live unfixed cells shows characteristic endosomal distribution of peptides [36]. Peptide uptake is inhibited by incubation at low temperature, by cellular ATP pool depletion and by inhibitors of endocytosis [37]. Similar data were obtained for Tat-conjugated PNA. These data are consistent with the involvement of endocytosis in the cellular internalization of CPP and their conjugates to PNA. Although much remains to be done to delineate the CPP mechanism of uptake, entrapment within endocytic vesicles may be limiting in this strategy as indicated in Section 5.

Numerous methods have been reported for the synthesis of CPP–ON conjugates. The few previously claimed successes for cell delivery and biological activity of CPP–ON conjugates have all used disulfide linkages between oligonucleotide and peptide moieties [38]. We have defined a simplified method for oligonucleotide activation leading to high yield synthesis of peptide–ON chimera through a disulfide bridge [39].

An example of the intracellular trafficking of ON when delivered with Tat conjugation is given in Fig. 2. We carried out fluorescence microscopy analysis of endothelial HUVEC and HeLa live cells treated with Tat–PNA. Alexa labeled Tat–PNA conjugates (green fluorescence) rapidly enter cells and essentially distribute in a punctuate pattern in the cytoplasm (Fig. 2A). This localization corresponds to endosomal vesicles as attested by co-localization with the transferrin-alexa 546 (red fluorescence, Fig. 2B) endosomes marker (yellow staining) (Fig. 2C). This distribution pattern is not modified and fades upon a longer incubation period. Intracellular fluorescence is not detected when free PNA is used suggesting no (or poor) PNA cell uptake (data not showed). However, there is no detectable release of PNA into the cytosol, and consequently, no apparent distribution in the nuclear compartment.

While investigating the role of arginine rich motifs in gene delivery, it was demonstrated that oligomers of TAT CPP compacted plasmid DNA to nanometric particles and stabilized DNA toward nuclease degradation. Such TAT peptide complexes were superior to PEI in terms of transfection efficiency. In addition, gene transfer was enhanced due to TAT nuclear localization sequence. TAT CPP interacted with plasmid DNA electrostatically and the resulting complexes were transferred to mammalian cells by an endocytosis-mediated pathway [37,40,41].

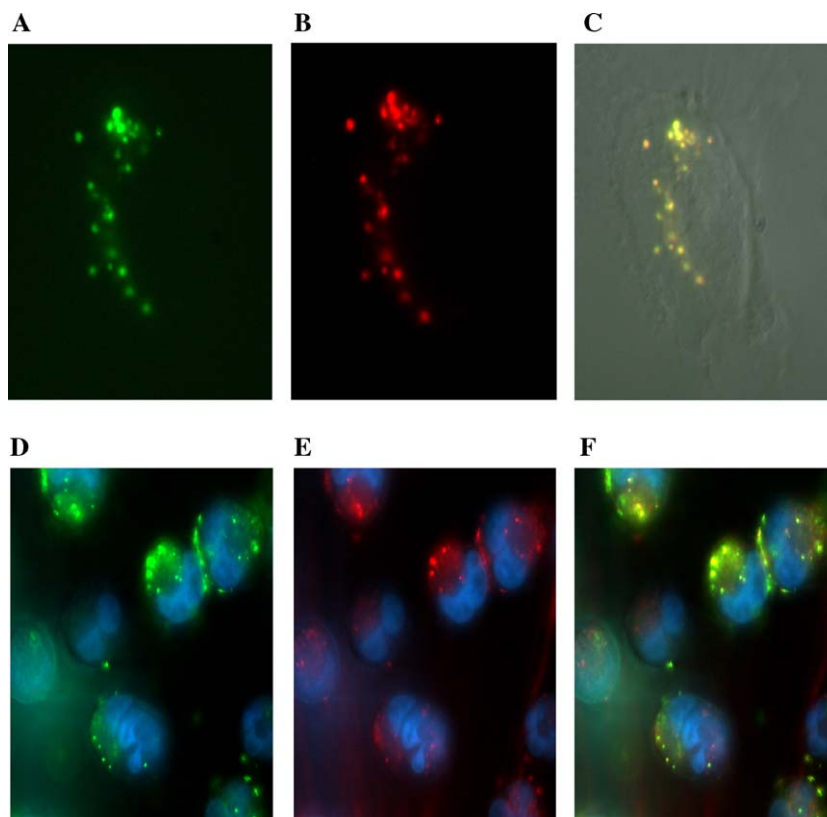


Fig. 2. Fluorescence microscopy images in unfixed HUVEC (panels A–C) or HeLa pLuc 705 (panels D–F) cells. HUVEC cells incubated with 1  $\mu$ M of Tat–PNA (Alexa 488) (green color) for 30 min at 37  $^{\circ}$ C (panel A) and thereafter with 25  $\mu$ g/ml transferrine-alexa 546 (red fluorescence) (panel B) for 5 min. HeLa pLuc 705 cells incubated with 2  $\mu$ M Fam tagged (green fluorescence (Lys)8–PNA<sub>705</sub>–Lys (panel D) for 4 h and thereafter with Alexa 546-tagged (red fluorescence) transferrin (panel E) for 5 min. Nuclei were stained with Hoechst (blue fluorescence) for 5 min. Co-localization was revealed in panels C and F (yellow staining). TAT–PNA conjugates were synthesized and characterized as described in [36].

#### 4.2. Lipoplexes

As previously stated, the association of antisense ONs (and more recently of siRNA) to several commercially available cationic lipid formulations is, for the time being, the most reliable and easy strategy to transfect these ON into cells in vitro, despite occasional side effects and resistance of several primary cells. Careful optimization should however be completed for each application as the efficacy (and importantly the toxicity) of different formulations vary depending on the cell type and ON analog utilized. Complex formation of DNA with cationic lipids [42] leads to the respective condensation of both entities by electrostatic interactions. As a consequence, control of the thermodynamic parameters of complex formation is crucial to obtain homogeneous and reproducible particles. In addition, lipoplexes global net charge is cationic leading to instability in the presence of serum and toxicity [9–11]. Positively charged lipoplexes indeed bind to anionic serum proteins. This leads to inactivation and toxicity (for instance to red blood cells) and first pass effect in lung [10]. This is the reason why most successful in vivo data were obtained with using local administration of nucleic acids. Pharmacologically efficient synthetic vectors are therefore still lacking for most in vivo applications and clinical developments, especially for systemic administration.

Our initial goal was to obtain pharmaceutically suitable vectors regarding stability and reproducibility. We have

designed and developed an efficient lipidic vector termed as DLS [11,12]. We have set and defined the optimal thermodynamic conditions either for the lipids or the nucleic acid presentation. Lipids were presented in a liposome forming specific Small Unilamellar Vesicles (SUV) composed of a poly-cationic lipid (DOGS) and a neutral lipid (DOPE) [11–13]. DLS SUVs interacted with DNA to form highly stable (up to 3 months at 4  $^{\circ}$ C) and homogeneous (120 nm  $\pm$  20%; polydispersity=20) complex particles [11,43]. Uptake and intracellular distribution were studied in various cell culture models with various ON types (modified or unmodified) [29,43,44]. Our observations suggested that complete DNA release from the endocytic vesicles can be achieved and support the notion of the complete or partial release of the DNA from the lipidic carrier [28,29,44].

We have evaluated the specificity and activity of antisense ON against HIV infection with regard to dose–response range, number and choice of experimental controls, ON backbone modifications, type of cell infection, length of assays and delivery approach by the DLS lipoplex system [8]. The highest potency (IC<sub>50</sub> level at picomolar range) was observed in a short-term chronic infection model with DLS-delivered ON where the DLS delivery improved the ON activity up to 10<sup>6</sup> times compared to free chemically modified ONs [8,43]. Likewise, we recently reported the use of antisense ON directed against VEGF RNA for treating AIDS Kaposi's



Sarcoma in vitro and in vivo setting [29]. Up to 93% of sequence specific inhibition of tumorigenesis was observed with using a clonogenic assay. Significant activity (39% inhibition) was observed at nanomolar range dose (10 nM). Daily intra-tumoral administration of VEGF-ON conduces to a marked change in tumor growth, in cell proliferation and in the number of mitotic figures as observed in thin tissue sections [29].

Biophysical examination of Neutraplex and DLS revealed a specific ultrastructure consisting of liquid crystals composed of lamellar or hexagonal phases [46]. This specific ultrastructure may be responsible for the high reproducibility and homogeneity of these lipoplex particles. Remarkably, the concentric and lamellar structure with different packing regimes was also observed with linear double-stranded DNA, single-stranded DNA and circular double-stranded plasmid DNA [46].

Systemic administration of plasmid DNA delivered with the DLS system led to widespread and long-lasting reporter gene expression [12]. We further demonstrated increased DNA plasma half-life and efficient uptake in blood cells following intravenous administration in mice [13]. The DLS system was applied in various in vivo models for therapeutic gene transfer such as human MDR1 expression in mouse bone marrow progenitor cells [47], and glucocerobrosidase gene transfer [48].

Despite their very low positive charge ratio (1.7 compared to 4.0–8.0 for commercially available formulations), DLS still suffer from drawbacks inherent to lipoplex vectors for in vivo application, especially when considering systemic administration of nucleic acids [10–11]. Whereas DLS mediated gene transfer is not inhibited by serum [11,13,47,48], DLS-ON activity is slightly inhibited in serum containing medium. However, high level ON activity was observed at concentrations in serum-containing medium to which no effect could be detected with commercially available cationic lipids such as Lipofectamine.

We have therefore developed for the first time an anionic lipoplex delivery system named Neutraplex™ [14]. These particles are composed of a poly-cationic lipid (DOGS), a neutral lipid (DOPE), and an anionic phospholipid (cardiolipin) that interacted with DNA [46]. The pharmacokinetics and bioavailability following intravenous administration in baboons of an ON delivered either in a free form, or using a cationic or the Neutraplex carrier system were compared [14]. Whole body distributions and metabolism was monitored using Positron Emission Tomography and an enzyme-based competitive hybridization assay. Free phosphodiester ON showed typical pharmacokinetics, e.g., high liver and kidney concentration, rapid plasmatic degradation and elimination from the body. The cationic vector slightly protected ON against degradation and enhanced uptake by the reticulo-endothelial system but not by other organs. In contrast, the anionic vector dramatically enhanced the uptake in several organs, including the lungs, spleen and brain, with a prolonged accumulation of radioactivity in the brain. Using this vector, intact ON were detected in the plasma for up to 2 h after injection, and the  $T_{1/2\beta}$  (ON half life) and distribution volume increased by 4- and 7- fold, respectively [14]. No evidence of toxicity was found upon administration of 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  every week over a 4-week

period. The anionic vector thus improved significantly the bioavailability and the pharmacokinetics profile, and appears as a promising delivery system for in vivo administration of therapeutic ON.

As delivery to cells is not enough to ensure ON activity, ON bioavailability in cellular compartments was investigated [29,44,45]. Our long experience in studying nucleic acids intracellular distribution proved to us the need of observing labeled ON solely in live cells as fixing agents modify integrity of intracellular membranes and modify intracellular trafficking [13,29,36,44]. An example of uptake in live cells with lipoplex systems is presented in Fig. 3. Epifluorescence images of unfixed HeLa ovarian cancer cells incubated with 2'-O-methyl modified ON delivered with the DLS system are presented. Following 2-h incubation FITC (green fluorescence) labeled ON distribute nearly exclusively in small cytoplasmic vesicles in the cytoplasm (Fig. 3A). This vesicular localization corresponds to endosomes since Transferrin-alexa 546 (red fluorescence) nearly completely co-localizes with ON (yellow fluorescence) (Fig. 3B and C). Following 12-h incubation, the green fluorescence mainly distribute in the nucleus whereas punctuate Transferrin red fluorescence remains in cytoplasmic vesicles (Fig. 3D and E). This suggests a rapid escape of ON from the endosomes, release in the cytosol and apparent complete diffusion of ON into the nucleus as previously described [13,29,44]. It was shown that ON have a “natural tropism” to the nucleus since ON microinjected in cytoplasm rapidly localize in the nucleus [49]. Optimal nuclear penetration was observed after a 12-h incubation time period, the overall fluorescence intensity being markedly decreased following 24 h incubation (data not shown). Whereas free ON poorly penetrate in cells and mainly distribute in endocytic organelles [28,29], DLS lipoplexes thus facilitate ON delivery in the nuclear compartment.

## 5. Basic peptides and lipoplexes for the delivery of splice correcting oligonucleotides

The efficiency with which CPP and lipoplexes allow for the delivery of splice correcting ON has been assessed in the elegant model proceeded by Kole et al. [2]. In this assay, a mutated intron carrying an aberrant splice site has been inserted within a luciferase reporter gene, thus preventing the production of a functional mRNA. The hybridization of a RNaseH incompetent ON analogue to this cryptic splice site restores correct splicing and consequently the production of luciferase (Fig. 1). This assay is now considered as the most valuable to assess in vitro or in vivo nuclear delivery of an antisense ON since it provides a positive readout. In this assay, we use 18 mer 2'-O-methyl ON (ON<sub>705</sub>) or PNA (PNA<sub>705</sub>) as designed by Kole and co-workers [50].

### 5.1. Use of DLS lipoplex for delivering steric block ON in Kole's model

Luciferase activity in DLS-Antisense sequence (DLS-ON<sub>705</sub>) treated cells was 22- and 28-fold higher than that of

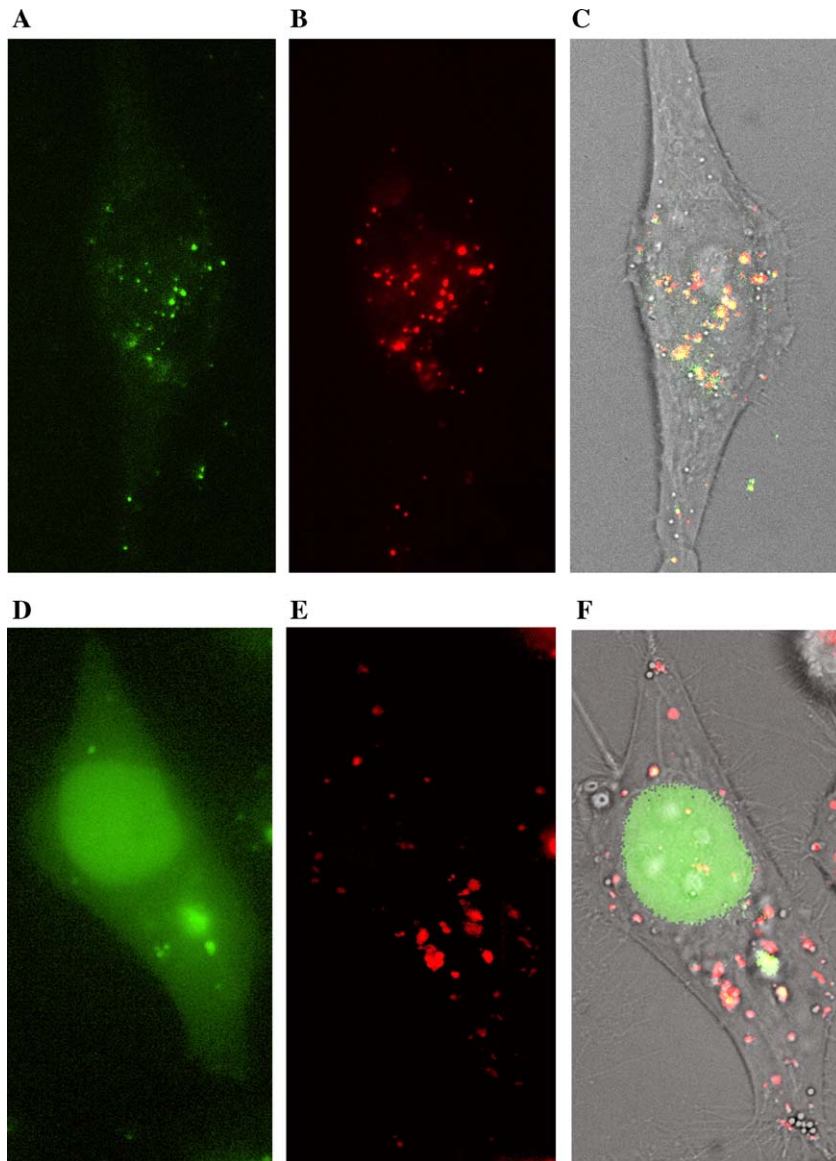


Fig. 3. Fluorescence microscopy images of live HeLa pLuc 705 cells. Cells were incubated with 200 nM FITC ON<sub>705</sub> (green color) (panels A and D), using the DLS delivery system, in optiMEM medium for 2 h (panels A–C) or 12 h (panels D–F) or with 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  transferrin-alexa 546 (red fluorescence) (panels B and C). Colocalization was revealed in panels C and F (yellow staining). DLS lipoplexes were prepared as described in [43].

cells treated with the scrambled control sequence or untreated cells, respectively (Fig. 4A). No detectable activity was observed with free antisense ON (data not shown). Kinetic study enabled us to determine an optimal treatment time between 12 and 24 h. Dose response experiments showed an optimal sequence specific activity at 100 nM with no detectable toxicity up to 300 nM. A statistically significant difference (Student's *t*-test,  $P \leq 0.05$ ) between the DLS-ON<sub>705</sub> and the DLS-ON<sub>sc</sub> was observed at ON doses as low as 1 nM (Fig. 4B). Moreover, the DLS-ON<sub>705</sub> was approximately 2.5 times more effective than lipofectamine-ON<sub>705</sub> (LFA) in optiMEM medium (Fig. 4A). High level luciferase expression was observed in cells incubated with DLS-ON<sub>705</sub> in serum-containing medium while no activity was found in cells treated with Lipofectamine (LFA)-delivered ON at a concentration of 100 nM (data not shown). The marked increase of luciferase activity in cells incubated with a scrambled control ON (ON<sub>sc</sub>) delivered with LFA compared with that of

untreated cells illustrates toxic effect or metabolic changes arising from the use of the LFA lipids. Correction of splicing alterations in thalassemia transgenic mouse models will be evaluated with these lipoplex formulations.

### 5.2. Use of basic peptides for delivering steric blocking ODN in Kole's model

As mentioned in section 3, the conjugation of a small oligolysine tail to the C-terminus of an uncharged steric block PNA was able to mask a splice site and to re-orient pre-mRNA maturation (PNA<sub>705</sub>). This elegant and simple strategy could provide an alternative to lipoplexes or CPPs delivery.

As shown in Fig. 4, free PNA 705-Lys did not increase luciferase activity in keeping with the inefficient cellular uptake reported in previous studies [50,51]. Surprisingly however, splicing correction by the (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys conjugate was



Fig. 4. Luciferase activity in pLuc705 HeLa cells transiently transfected during 24 h with antisense ON<sub>705</sub> or scrambled ON (ON<sub>sc</sub>), using the DLS delivery system, in optiMEM medium. (A) Comparison of transfection efficiency between the DLS delivery system and lipofectamine (LFA), at a concentration of 30 nM ON. (B) Effect of ON doses in DLS. ON<sub>705</sub> (black columns) and scrambled ON (shaded) are compared. The experiment corresponding to non-treated cells is showed (white column). Values are means ( $\pm$ S.D.) of triplicate Luciferase determinations from three independent experiments. Bar between two columns represents multiplication factor. The activity of luciferase was normalized in total cellular protein and is presented in relative luminescence units (RLU) per  $\mu\text{g}$  of protein. Statistical differences between RLU/ $\mu\text{g}$  values from scrambled and antisense oligonucleotides treated cells were evaluated: \* $P \leq 0.05$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ . Luciferase expression was monitored as described in [50].

barely significant as compared to luciferase expression achieved with lipoplex-delivered 2'OMet ON analogues. Likewise, a (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys construct of appropriate sequence was ineffective in a TAT/TAR transactivation inhibition assay in a parallel study [60].

Since FACS analysis established that (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys conjugates were internalized efficiently by an energy-dependent mechanism, the low biological activity in the splicing correction assay could result from sequestration in endocytic compartments and/or from degradation by lysosomal enzymes (although the modified backbone of PNAs renders them rather resistant to proteases and nucleases).

Accordingly, fluorescence microscopy analysis of live unfixed HeLa pLuc 705 cells incubated with (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys (Fam) revealed a characteristic cytoplasmic punctate distribution. Little if any (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys (Fam) staining could be detected in cell nuclei (Fig. 2D–F).

The most commonly used pharmacological agent to promote increased delivery of drugs sequestered in endocytic compartments is chloroquine, a lysosomotropic amine acting as a buffering agent and as a consequence preventing endosome

acidification [51]. It has, in particular, been used to improve the functional delivery of plasmid DNA by non-viral vectors [53,54]. Cells were co-incubated with the (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys conjugate and 100  $\mu\text{M}$  chloroquine for 4 h, a protocol in which no significant chloroquine-induced cytotoxicity was observed (as monitored by the absence of propidium iodide labeling). As shown in Fig. 5A, chloroquine co-treatment very significantly increased splicing correction by (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys conjugates and correction reached comparable levels observed with 2'OMet ON delivered with DLS lipoplexes. Chloroquine did not increase the efficiency of free PNA as expected since neutral PNAs are very poorly internalized [55]. The sequence-specificity of splicing correction was verified with a scrambled version of the (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys construct (Fig. 5). Relatively high concentrations (500 nM or more) of the conjugate were nevertheless required to achieve a significant increase in luciferase activity even in the presence of chloroquine. Although it is difficult to compare steric block agents which differ in their chemistry, 2'OMet ON were active in the low nanomolar range when delivered with DLS lipoplexes (Fig. 4). On the other hand, correction by (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys con-

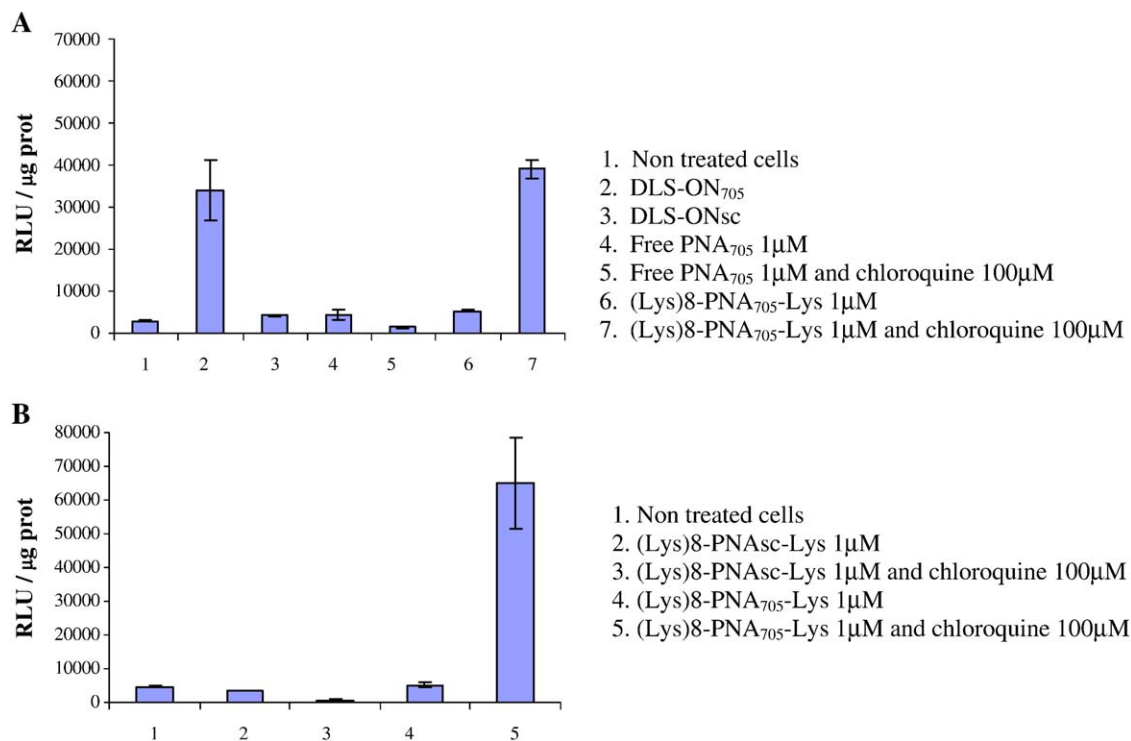


Fig. 5. Effect of chloroquine on splicing correction by (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys conjugate. (A) HeLa pLuc 705 were incubated in the absence of correcting ON (1), in the presence of 30 nM ON<sub>705</sub> (2) and ON<sub>sc</sub> (3) delivered with DLS lipoplex, 1 μM free splice correcting PNA<sub>705</sub> without (4) or with (5) chloroquine (100 μM), or in the presence of 1 μM (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys without (6) or with (7) chloroquine (100 μM). Data are expressed in RLU/μg protein. Experiments have been made in triplicate and averaged. Error bars are indicated. (B) Specificity of splicing correction. Cells were incubated in presence of 1 μM (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys scrambled-Lys without (2) or with (3) chloroquine (100 μM), or in presence of (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys 1 μM without (4) or with (5) chloroquine (100 μM). Control in with no addition (1). Data are expressed as in panel A.

jugates was as efficient when the entire experiment was carried out in serum-containing culture medium while lipoplex delivery was partially inhibited by serum proteins in keeping with previous studies with cationic lipid formulations [30].

Likewise, cell incubation in the presence of high sucrose concentration is known to promote endosome swelling and to increase release of endosome-sequestered material [52]. Co-incubation with 0.5 M sucrose largely increased luciferase expression in (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys treated cells but not in cells treated with the scrambled version of the conjugate (Abes et al, in press). These experiments clearly establish that sucrose or chloroquine treatment very significantly increases splicing correction by (Lys)<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>-Lys in a sequence-specific manner, in line with the well-established endosome-destabilizing activity of these two drugs. Likewise, endosome destabilization by lysosomotropic agents or by fusogenic peptides improved the functional delivery of Cre recombinase-TAT fusion proteins [56,57]. Moreover, chloroquine treatment significantly enhanced the inhibition of HIV-1 Tat-dependent trans-activation by PNA 16-mer either, stably polyether linked, or disulfide linked to several cell-penetrating peptides [60].

## 6. Future directions

In optimal experimental conditions, basic peptides or lipoplexes efficiently deliver splice correcting ON in nuclei.

The apparent instability of most lipoplex formulations in serum containing medium appears as a drawback for in vivo applications. The development of negatively charged [9,14] or sterically stabilized lipoplexes will be required for systemic administration. However, cationic lipoplexes could potentially be useful when local administration is appropriate to achieve disease treatment. Second, more has to be done to reduce the toxicity of cationic constituents for red blood cells, for instance.

Basic peptides or CPP are advantageous vector system compared to particulate systems regarding synthesis, cost, and pharmaceutical development, in particular for quality control and scalable process production. In contrast to lipoplexes, basic peptides make possible delivery of uncharged PNA or PMO. One of the basic peptides drawback appears to be the need of the concurrent treatment of endosomes releasing agents in order to concentrate ON in the nucleus where splice correction occurs. Although lysosomotropic agents such as chloroquine are pharmacologically well known, the presence of a third constituent, in addition to the steric block ON and the basic peptide heteroconjugate, might decrease the tolerated clinical doses. Multifunctional basic peptides containing for instance an hydrophobic part or a nuclear localization signal [58] might be a solution to improve intracellular trafficking and their efficacy [59]. Basic peptides hetero-conjugation for ON delivery seems as well to partially protect ON towards degradation and activity requires higher doses compared to lipoplex (10- to 100-fold). All those parameters should be taken into consideration in



order to evaluate their use in therapy. Despite severely complicating formulation process, combining both approaches might improve delivery parameters, and this is under investigation in our laboratory.

### Acknowledgments

This work was supported by IFCPAR (contract 3205-A) and by EC framework 5 (contract QLK3-CT-2002-01989). Said Abes is the recipient of a pre-doctoral fellowship from the Ligue contre le Cancer.

### References

- [1] M.A. Garcia-Blanco, A.P. Baraniak, E.L. Lasda, Alternative splicing in disease and therapy, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 535–546.
- [2] P. Sazani, R. Kole, Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 481–486.
- [3] J. Kurreck, Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 1628–1644.
- [4] J.B. Opalinska, A.M. Gewirtz, Nucleic acid therapeutics: a work in progress, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3 (2002) 928–933.
- [5] T. Tuschl, RNA interference and small interfering RNAs, *ChemBioChem* 2 (2001) 239–245.
- [6] M.J. Mann, V.J. Dzau, Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 1071–1075.
- [7] T.A. Rando, Oligonucleotide-mediated gene therapy for muscular dystrophies, *Neuromuscul. Disord.* 12 (Suppl. 1) (2002) S55–S60.
- [8] C. Lavigne, J. Yelle, G. Sauve, A.R. Thierry, Is antisense an appropriate nomenclature or design for oligodeoxynucleotides aimed at the inhibition of HIV-1 replication? *AAPS PharmSciTech* 4 (2002) E9.
- [9] A.R. Thierry, A.R., L.C. Mahan, Therapeutic applications of lipid-based gene delivery systems, in: A. Rolland (Ed.), *Advanced Gene Delivery*, 1998, pp. 123–134.
- [10] A.R. Thierry, E. Vives, J.P. Richard, P. Prevot, C. Martinand-Mari, I. Robbins, B. Lebleu, Cellular uptake and intracellular fate of antisense oligonucleotides, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 5 (2003) 133–138.
- [11] A.R. Thierry, Optimization of lipoplex formulations for intravenous gene delivery, *J. Liposome Res.* 7 (1997) 143–160.
- [12] A.R. Thierry, Y. Lunardi-Iskandar, J.L. Bryant, P. Rabinovich, R.C. Gallo, L.C. Mahan, Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 9742–9746.
- [13] A.R. Thierry, P. Rabinovich, B. Peng, L.C. Mahan, J.L. Bryant, R.C. Gallo, Characterization of liposome-mediated gene delivery: expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA, *Gene Ther.* 4 (1997) 226–237.
- [14] B. Tavitian, S. Marzabal, V. Boutet, B. Kuhnast, S. Terrazzino, M. Moynier, F. Dolle, J.R. Deverre, A.R. Thierry, Characterization of a synthetic anionic vector for oligonucleotide delivery using in vivo whole body dynamic imaging, *Pharm. Res.* 19 (2002) 367–376.
- [15] H. Brooks, B. Lebleu, E. Vives, Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics, *Adv. Drug Delivery Rev.* 57 (2005) 559–577.
- [16] J.S. Wadia, S.F. Dowdy, Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer, *Adv. Drug. Delivery Rev.* 57 (2005) 579–596.
- [17] D.R. Mercatante, P. Sazani, R. Kole, Modification of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy for cancer and other diseases, *Curr. Cancer Drug Targets* 1 (2001) 211–230.
- [18] G. Lacerda, H. Sierakowska, C. Carestia, S. Fucharoen, J. Summerton, D. Weller, R. Kole, Restoration of hemoglobin A synthesis in erythroid cells from peripheral blood of thalassemic patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 9591–9596.
- [19] J.G. Karras, R.A. McKay, N.M. Dean, B.P. Monia, Deletion of individual exons and induction of soluble murine interleukin-5 receptor- $\alpha$  chain expression through antisense oligonucleotide-mediated redirection of pre-mRNA splicing, *Mol. Pharmacol.* 58 (2000) 380–387.
- [20] N. Kipshidze, M. Tsapenko, P. Iversen, D. Burger, Antisense therapy for restenosis following percutaneous coronary intervention, *Expert Opin. Biol. Ther.* 5 (2005) 79–89.
- [21] R.V. Giles, D.G. Spiller, R.E. Clark, D.M. Tidd, Antisense morpholino oligonucleotide analog induces missplicing of C-myc mRNA, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 9 (1999) 213–220.
- [22] Q.L. Lu, C.J. Mann, F. Lou, G. Bou-Gharios, G.E. Morris, S.A. Xue, S. Fletcher, T.A. Partridge, S.D. Wilton, Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse, *Nat. Med.* 9 (2003) 1009–1014.
- [23] S. Bogdanovich, K.J. Perkins, T.O. Krag, T.S. Khurana, Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions, *J. Mol. Med.* 82 (2004) 102–115.
- [24] A. Goyenvalle, A. Vulin, F. Fougerousse, F. Leturcq, J.C. Kaplan, L. Garcia, O. Danos, Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping, *Science* 306 (2004) 1796–1799.
- [25] P. Sazani, F. Gemignani, S.H. Kang, M.A. Maier, M. Manoharan, M. Persmark, D. Bortner, R. Kole, Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues, *Nat. Biotechnol.* 20 (2002) 1228–1233.
- [26] H.M. Moulton, M.C. Hase, K.M. Smith, P.L. Iversen, HIV Tat peptide enhances cellular delivery of antisense morpholino oligomers, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 13 (2003) 31–43.
- [27] B.L. Gebiski, C.J. Mann, S. Fletcher, S.D. Wilton, Morpholino antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 23 skipping in mdx mouse muscle, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 1801–1811.
- [28] A.R. Thierry, A. Dritschilo, Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 5691–5698.
- [29] C. Lavigne, Y. Lunardi-Iskandar, B. Lebleu, A.R. Thierry, Cationic liposomes/lipids for oligonucleotide delivery: application to the inhibition of tumorigenicity of Kaposi's sarcoma by vascular endothelial growth factor antisense oligodeoxynucleotides, *Methods Enzymol.* 387 (2004) 189–210.
- [30] O. Zelphati, C. Nguyen, M. Ferrari, J. Felgner, Y. Tsai, P.L. Felgner, Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery, *Gene Ther.* 5 (1998) 1272–1282.
- [31] D. Derossi, A.H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 10444–10450.
- [32] E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16010–16017.
- [33] M. Pooga, A. Jureus, K. Razaeei, H. Hasanvan, K. Saar, K. Kask, P. Kjellen, T. Land, J. Halonen, U. Maeorg, A. Uri, S. Solyom, T. Bartfai, U. Langel, Novel galanin receptor ligands, *J. Pept. Res.* 51 (1998) 65–74.
- [34] M. Zorko, U. Langel, Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery, *Adv. Drug Delivery Rev.* 57 (2005) 529–545.
- [35] A. Astriab-Fisher, D. Sergueev, M. Fisher, B.R. Shaw, R.L. Juliano, Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions, *Pharm. Res.* 19 (2002) 744–754.
- [36] J.P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M.J. Gait, L.V. Chernomordik, B. Lebleu, Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 585–590.
- [37] J.P. Richard, K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu, L.V. Chernomordik, Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 15300–15306.
- [38] J.J. Turner, A.A. Arzumanov, M.J. Gait, Synthesis, cellular uptake and HIV-1 Tat-dependent trans-activation inhibition activity of oligonucleotide analogues disulphide-conjugated to cell-penetrating peptides, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 27–42.
- [39] F. Maurel, F. Debard, F. Clavelier, A.R. Thierry, B. Lebleu, J.J. Vasseur, E. Vives, Toward high yield synthesis of peptide-oligonucleotide chimera

- through a disulfide bridge : A simplified method for oligonucleotide activation, *Bioorganic Med. Chem. Let.* 15 (2005) 5084–5087.
- [40] M. Silhol, M. Tyagi, M. Giacca, B. Lebleu, E. Vives, Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 494–501.
- [41] B. Gupta, T.S. Levchenko, V.P. Torchilin, Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides, *Adv. Drug Delivery Rev.* 57 (2005) 637–651.
- [42] P.L. Felgner, Y. Barenholz, J.P. Behr, S.H. Cheng, P. Cullis, L. Huang, J.A. Jessee, L. Seymour, F. Szoka, A.R. Thierry, E. Wagner, G. Wu, Nomenclature for synthetic gene delivery systems, *Hum. Gene. Ther.* 8 (1997) 511–512.
- [43] C. Lavigne, A.R. Thierry, Enhanced antisense inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in cell cultures by DLS delivery system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237 (1997) 566–571.
- [44] J. Lisziewicz, D. Sun, F.F. Weichold, A.R. Thierry, P. Lusso, J. Tang, R.C. Gallo, S. Agrawal, Antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate complementary to Gag mRNA blocks replication of human immunodeficiency virus type 1 in human peripheral blood cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 7942–7946.
- [45] G.B. Takle, A.R. Thierry, S.M. Flynn, B. Peng, L. White, W. Devonish, R.A. Galbraith, A.R. Goldberg, S.T. George, Delivery of oligoribonucleotides to human hepatoma cells using cationic lipid particles conjugated to ferric protoporphyrin IX (heme), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7 (1997) 177–185.
- [46] M. Schmutz, D. Durand, A. Debin, Y. Palvadeau, A. Etienne, A.R. Thierry, DNA packing in stable lipid complexes designed for gene transfer imitates DNA compaction in bacteriophage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 12293–12298.
- [47] I. Aksentijevich, I. Pastan, Y. Lunardi-Iskandar, R.C. Gallo, M.M. Gottesman, A.R. Thierry, In vitro and in vivo liposome-mediated gene transfer leads to human MDR1 expression in mouse bone marrow progenitor cells, *Hum. Gene. Ther.* 7 (1996) 1111–1122.
- [48] M. Baudard, T.R. Flotte, J.M. Aran, A.R. Thierry, I. Pastan, M.G. Pang, W.G. Kearns, M.M. Gottesman, Expression of the human multidrug resistance and glucocerebrosidase cDNAs from adeno-associated vectors: efficient promoter activity of AAV sequences and in vivo delivery via liposomes, *Hum. Gene. Ther.* 7 (1996) 1309–1322.
- [49] J.P. Leonetti, N. Mechti, G. Degols, C. Gagnor, B. Lebleu, Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 2702–2706.
- [50] S.H. Kang, M.J. Cho, R. Kole, Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development, *Biochemistry* 37 (1998) 6235–6239.
- [51] A.M. Siwkowski, L. Malik, C.C. Esau, M. Maier, E.V. Wancewicz, K. Albertshofer, B.P. Monia, C.F. Bennett, A.B. Eldrup, Identification and functional validation of PNAs that inhibit murine CD40 expression by redirection of splicing, *Nucleic Acids Res.* 32 (9) (2004) 2695–2706.
- [52] V. Ferrari, D.J. Cutler, Kinetics and thermodynamics of chloroquine and hydroxychloroquine transport across the human erythrocyte membrane, *Biochem. Pharmacol.* 41 (1991) 23–30.
- [53] K. Ciftci, R.J. Levy, Enhanced plasmid DNA transfection with Lysosomotropic agents in cultured fibroblasts, *Int. J. Pharm.* 218 (2001) 81–92.
- [54] D.S. Manickam, H.S. Bisht, L. Wan, G. Mao, D. Oupicky, Influence of TAT-peptide polymerization on properties and transfection activity of TAT/DNA polyplexes, *J. Control. Release* 102 (2005) 293–306.
- [55] U. Koppelhus, S.K. Awasthi, V. Zachar, H.U. Holst, P. Ebbeson, P.E. Nielsen, Cell-dependant differential cellular uptake of PNA, peptides and PNA-peptide conjugates, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 12 (2002) 51–63.
- [56] N.J. Caron, S.P. Quenneville, J.P. Tremblay, Endosome disruption enhances the functional nuclear delivery of Tat-Fusion proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319 (2004) 12–20.
- [57] J.S. Wadia, R.V. Stan, S.F. Dowdy, Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis, *Nat. Med.* 10 (3) (2004) 310–315.
- [58] M.C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 1173–1176.
- [59] S. Deshayes, A. Heitz, M.C. Morris, P. Charnet, G. Divita, F. Heitz, Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis, *Biochemistry* 43 (2004) 1449–1457.
- [60] J. Turner, G.D. Ivanova, B. Verbeure, D. Williams, A.A. Arzumanov, S. Abes, B. Lebleu, M.J. Gait, Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells, *Nucl. Acids Res.* (in press).

## ARTICLE II

**« Modulation de l'expression du transgène par la correction de l'épissage alternatif aberrant ; utilisation d'oligonucléotides à blocage stérique multi-cibles »**

The Journal of Gene Medicine

Volume **9**(6):498-510, 2007

## I. INTRODUCTION.

Dans la stratégie utilisant les lipides cationiques pour corriger l'épissage alternatif anormal, plusieurs analogues d'ON de 18 ou 19 mers ont été testés et complexés aux DLS :

◆ ON de 2<sup>ème</sup> génération : 2'O-Me, 2'O-Me-PS, MOE-PS

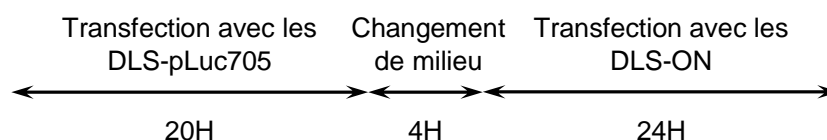
◆ ON de 3<sup>ème</sup> génération : PMO.

Tous ces ON modifiés n'activent pas la RNase H, ce qui est nécessaire pour ce modèle. De par leur hybridation par encombrement stérique, ces ON sont qualifiés de « steric-block » ON. En utilisant le même vecteur pour la délivrance des ON modifiés, on obtient la même pénétration cellulaire, l'intérêt étant de comparer directement l'activité des divers ON.

Tout d'abord, l'optimisation de la délivrance d'ON antisens par les DLS dans les cellules pLuc705 a été mise en œuvre à partir des paramètres suivants : durée de transfection et de post-transfection, concentration d'ON finale, ON contrôles négatifs (ON<sub>705M</sub> avec une seule mutation ou ON<sub>SC</sub>), ratios utilisés entre les lipides cationiques et les ON.

Par ailleurs, 2 sites ont été ciblés par les ON : en positions 705 et 623. Le site 705 correspond toujours au site cryptique d'épissage, c'est-à-dire à la mutation qu'il faut masquer. Le site 623 de l'intron  $\beta$ -thalassémique correspondrait à un site impliqué dans l'épissage alternatif et le cibler corrigerait aussi l'épissage (Gemignani *et al.* 2001 et données non publiées). Les 2 sites ont été ciblés séparément et simultanément.

Ensuite, nous avons conçu un modèle original appliqué à des cellules HeLa non transformées. Dans un 1<sup>er</sup> temps, le plasmide pLuc705 a été transfecté une fois complexé aux DLS. Dans un 2<sup>ème</sup> temps, les ON correcteurs ont été délivrés avec le même vecteur : une nécessité pour la thérapie génique. Les délivrances d'ADNp et d'ON ont été optimisées *in vitro*. Le but ici est d'utiliser les ON pour contrôler l'expression d'un transgène, la luciférase.



## II. CONTRIBUTION.

Dans cet article, j'ai réalisé la totalité des expériences dont les résultats sont présentés, excepté celles de microscopie, qui ont été réalisées par un étudiant stagiaire de MASTER que

j'ai encadré, Adrian TRAVO. Les oligonucléotides MOE et morpholino nous ont été fournis par le Dr. Ryszard KOLE, qui a largement participé à la compréhension de l'ensemble de ces résultats.

### **III. CONCLUSION.**

La délivrance d'ON antisens par les DLS conduit à une transfection efficace des ON jusqu'au noyau, et de la sorte à une correction efficace de l'épissage. Les liposomes et les lipoplexes montrent comme pour le passé (Thierry *et al.* 1997) des formulations de particules inférieures à 200nm, avec une dispersion monomodale. Les DLS sont un vecteur d'AN efficace même à de faibles concentrations en ON (significatif à partir de 10nM dans le milieu contenant 10% de sérum) et toxiques à partir de 1µM. Les MOE-PS ON se sont avérés les analogues les plus efficaces avec le système DLS, certainement les plus résistants vis-à-vis des nucléases et les plus stables au niveau de leur hybridation sur le pré-ARNm.

La formulation des DLS avec des analogues neutres comme les PMO et les PNA s'est avérée impossible (données non publiées). En effet, les charges positives des liposomes nécessitent des charges négatives pour former des complexes. De même, la délivrance de DLS-ON (2'O-Me, 2'O-Me PS, MOE) est beaucoup plus efficace que la transfection par les mêmes ON libres, c'est-à-dire non complexés, aux mêmes concentrations (données non publiées).

Les DLS-ON ont pu efficacement corriger l'épissage (modèle des HeLa pLuc705). L'effet a été potentialisé par le ciblage simultané des sites 623 et 705 et un effet synergique a même été observé, pour des concentrations de 100 à 200nM d'ON. Le site 623 de l'intron serait un site activateur d'épissage (Gemignani *et al.* 2001) ; notre hypothèse est qu'un site 5' donneur d'épissage est situé non loin de la position 623. Une fois masqué, l'épissage va alors se réorienter vers le site 5' donneur suivant le plus proche, situé à la limite entre l'intron et le 2<sup>ème</sup> exon.

Nous avons démontré qu'il était possible de moduler l'expression d'un transgène, la luciférase, en utilisant des DLS-ON dans le modèle de cellules HeLa non transformées. De la même façon que pour la correction de l'épissage, la délivrance a été optimisée et l'effet a été potentialisé en ciblant à la fois les sites 623 et 705. De ce fait, l'administration d'ON « steric

block » pourrait permettre de réguler l'expression d'un transgène spécifique, intégré dans le génome ou bien sous forme épisomale, pour répondre à une nécessité de la thérapie génique.

**IV. ARTICLE II.**

**Switching on transgene expression by correcting aberrant splicing with using multi-targeting steric block oligonucleotides.**

Resina S., Kole R., Travo A., Lebleu B. and Thierry A.R.

*Journal of Gene Medicine*, 2007;**9**(6):498-510.

# Switching on transgene expression by correcting aberrant splicing using multi-targeting steric-blocking oligonucleotides

Sarah Resina<sup>1</sup>  
Ryszard Kole<sup>2</sup>  
Adrian Travo<sup>1</sup>  
Bernard Lebleu<sup>1</sup>  
Alain R. Thierry<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Département de Défenses Antivirales et Antitumorales, UMR 5235 CNRS, CC 086, Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France

<sup>2</sup>University of North Carolina, Lineberger Comprehensive Cancer Center, CB#7295, Chapel Hill, NC 27599-7295, USA

\*Correspondence to:

Alain R. Thierry, Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Département de Défenses Antivirales et Antitumorales, UMR 5235 CNRS, CC 086, Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France.

E-mail:

alain.thierry@univ-montp2.fr

## Abstract

**Background** Mutations leading to aberrant splicing are found as a cause of numerous pathologies. Splice-switching oligonucleotides (SSOs), which modify aberrant expression patterns of alternatively spliced mRNAs, are a novel means of potentially controlling such diseases.

**Methods** We used an experimental model in which a mutated  $\beta$ -globin intron, carrying an aberrant splice site at nucleotide 705, interrupts the coding region of the luciferase reporter gene inserted in HeLa pLuc/705 cells. We have optimized delivery of splice correcting, steric-blocking 2'-O-methyl SSOs targeting the 705 mutated region (2'-O-Me SSO<sub>705</sub>) with DLS (DLS: delivery liposomal system) lipoplexes.

**Results** Optimal luciferase activity for DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> was achieved at 100 nM and was detectable at concentrations as low as 10 nM in serum-containing culture medium, confirming the potential of DLS lipoplex-mediated nuclear SSO delivery as observed in cellular uptake studies. We confirmed by cytofluorometry and epifluorescence microscopy the high potential of the DLS lipoplex for cellular and nuclear oligonucleotide uptake. The DLS lipoplex was then used to directly compare the intracellular efficacy of various SSO chemistries and sequences in correction of aberrant splicing. 2'-O-Methoxyethyl-oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates had a greater activity than 2'-O-methyl phosphodiester or 2'-O-methyl-phosphorothioate oligoribonucleotides. Targeting the splicing enhancer 623 region upstream was as efficient as targeting the 705 splice site, and, remarkably, simultaneous targeting of both sites was more efficient than treatment of the cells either with 2'-O-Me SSO<sub>705</sub> or 2'-O-Me SSO<sub>623</sub> alone.

**Conclusions** We demonstrated that SSOs can switch on luciferase activity in HeLa cells previously transfected with the pLuc/705 plasmid via the same DLS vector and provides a novel approach to modulate the expression of a transgene. Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords** oligonucleotides; antisense; drug delivery; splicing; liposomes; gene therapy

## Introduction

Functional diversity of the human genome is expanded by the expression of alternatively spliced mRNA variants, particularly at specific stages of development or in specific cells and tissues. Moreover, up to 50% of all mutations that cause genetic diseases may



Received: 24 October 2006

Revised: 16 February 2007

Accepted: 7 March 2007

result in defective pre-mRNA splicing [1]. Manipulating the splicing pattern of mutant pre-mRNAs with steric-blocking splice-switching oligonucleotides (SSOs) can be effective as a means to control many diseases such as  $\beta$ -thalassemia, cystic fibrosis, or Duchenne muscular dystrophy (DMD) [1–4].

The paradigm of antisense oligonucleotide (ON)-based therapeutics relies upon the hybridization of a small single-stranded DNA or RNA fragment to a complementary mRNA [5]. Initial enthusiasm for gene silencing by ONs in clinical trials subsequently diminished, partly because of unspecific, non-antisense effects and toxicity [6]. However, the use of novel backbone modifications included in chimeric and gapmer ONs has recently brought ONs back into the scientific spotlight [7]. A particularly interesting application of fully backbone-modified ONs is to block spliceosome assembly at the targeted splice site or other splicing elements in pre-mRNA [2]. Due to highly degenerate nature of the mammalian pre-mRNA splicing signals, blocking of the splicing elements by the SSO does not result in a general inhibition of splicing, but in a shift of the spliceosome to another splice site. As a consequence, an alternative splicing pattern is established or a normally used alternative splice site is used with increased efficiency. For instance, SSOs have been used to restore correct pre-mRNA splicing patterns of  $\beta$ -globin in  $\beta$ -thalassemia [2,8–11]. Alternatively, SSOs were designed to promote exon skipping in dystrophin pre-mRNA originating from frame-disrupting mutations in the DMD gene that prematurely abort the synthesis of the dystrophin protein [12,13]. SSO-induced restoration of the DMD reading frame was observed in cultured muscle cells from DMD patients and in the *mdx* mouse model [14,15].

In order to shift splicing patterns, SSOs must be stable in serum, hybridize with high  $T_m$ , and form duplexes with the targeted RNA, which are not processed by RNase H and/or other nucleases. This is usually achieved by 2' modification of the sugar with *O*-methyl, *O*-methoxyethyl or *O*-aminopropyl groups or by backbone modifications such as in N3'  $\rightarrow$  P5' phosphoramidate, peptide nucleic acids (PNAs), phosphorodiamidate morpholino (PMO), or locked nucleic acids (LNAs) [2,9,13,16].

Despite improved pharmacological properties these modified ONs are poorly delivered into cells and cell nuclei. In cell culture, negatively charged ONs are therefore co-administered in complex with cationic compounds, in particular cationic lipids. Various commercially available cationic lipid formulations are, for the time being, the most reliable strategy to deliver nucleic acids into cells *in vitro*. However, formation of complexes between nucleic acids and cationic lipids (lipoplexes) [17] are difficult to control in terms of stability and size, leading to non-reproducible activity, especially when high dose is needed. As a consequence, the *in vivo* use of lipoplexes formed with commercially available cationic lipids or other co-polymers is limited to local administration [6]. This is due to their high net positive charge,

leading to non-specific binding to anionic serum proteins and, as a consequence, to inactivation. Although modified SSOs were effective in systemic delivery in mouse models [10,16,18,19] there is still a need for effective, non-toxic, cost-competitive ON delivery agents that will improve SSO bioavailability *in vivo* in animals and in clinical applications.

We have designed a formulation process allowing the preparation of stable and homogenous lipoplex particles of low positive net charge (DLS: delivery liposomal system) [20]. ON delivery by the DLS was first established in cell culture models such as inhibition of HIV-1 [7,21,22] or *in vivo* to treat AIDS Kaposi's sarcoma in mice [23]. The DLS was also applied to gene transfer *in vitro* [20,24] and *in vivo* in various experimental therapeutic models [25,26]. Importantly, widespread and longlasting reporter gene expression could be achieved [20,24].

The main objective of the present study is to demonstrate that an SSO can switch on the expression of a transgene previously transfected in cells via the same vector as used for SSO delivery providing an approach to modulate transgene expression, in the way of carrying out *in vivo* experiments with the same *in vivo* efficient delivery system. To achieve this goal we used an experimental model system for correcting the aberrant  $\beta$ -globin pre-mRNA splicing [9,11,24,27] and studied the parameters to produce optimal correction of splicing alteration, such as the choice of the target site, the sequence and the type of chemical modification of the SSO using DLS lipoplexes as delivery vehicle. In this assay the mutated  $\beta$ -globin intron carrying an aberrant splice site is interrupting the coding region of a luciferase reporter gene. The hybridization of steric-blocking SSO analogues at the aberrant splice site is re-directing the splicing machinery towards correct splicing and consequently allows for the production of functional, easily quantitated luciferase. Interestingly, a combination of two SSOs targeting the 705 splice site and the splicing signal at position 623 [28] of the mutated intron had a seemingly synergistic effect. Importantly, splicing correction in transformed and transfected HeLa cells can be achieved in the presence of serum suggesting SSO-induced modulation of transgene expression as an alternative to the use of conditional promoters.

## Materials and methods

### Cells and plasmid DNA

HeLa pLuc/705 cells were stably transfected with pLuc/705 plasmid where the luciferase sequence, used as a reporter gene, was interrupted by the thalassaemic aberrant  $\beta$ -globin intron [27]. Non-modified HeLa cells and HeLa pLuc/705 cells were cultured as exponentially growing subconfluent monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum



(FCS), 1% sodium pyruvate and non-essential amino acids.

## Oligonucleotides

The 2'-*O*-methyl- (2'-*O*-Me) and phosphorothioated 2'-*O*-methyl-oligoribonucleotides (2'-*O*-Me-PS) were purchased from Eurogentec SA (Seraing, Belgium). 2'-*O*-Methoxyethyl-oligoribonucleoside-phosphorothioates (2'-*O*-MOE) were a gift from ISIS Pharmaceuticals (Carlsbad, CA, USA). Morpholino oligomers were purchased from GeneTools (Philomath, OR, USA). Oligonucleotide sequences are listed in Table 1. SSO<sub>705</sub> is targeted to an aberrant splice site that is created in  $\beta$ -thalassemic patients by a T to G mutation at nucleotide 705 of intron 2 of the human  $\beta$ -globin gene [27]. SSO<sub>623</sub> is centered at nucleotide 623, on a sequence which appears to have splicing enhancing properties [28]. Three mismatches in NS<sub>654</sub> (654-3MM) prevent its hybridization to pLuc/705 pre-mRNA; consequently, NS<sub>654-3MM</sub> does not interfere with splicing and is considered as nonsense sequence. SCR<sub>705</sub> is the scrambled version of SSO<sub>705</sub>, corresponding to a random ON. For fluorescence microscopy and flow cytometry, 5'-FITC-labelled SSO<sub>705</sub> ONs were used. All ONs are 18-mers except for the 19-mer phosphorodiamidate morpholino SSO<sub>623</sub> (Table 1).

## Lipoplex preparation

Lipoplexes were prepared as previously described [22]. Briefly, DLS liposomes were formed by mixing 1 mg of dioctadecylamidoglycylspermidine (DOGS, Promega France, Charbonnières, France) and 1 mg of dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE, Sigma-Aldrich Chimie SARL, St. Quentin Fallavier, France) in 40  $\mu$ l of 90% ethanol. Formation of unilamellar liposomes was carried out by adding an excess of 360  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O. After homogenization by mixing, the mixture was incubated for at least 15 min. Complex formation (lipoplex particles) was achieved by mixing the preformed DLS (delivery liposomal system) liposomes (75  $\mu$ l) into a solution of nucleic acids (50  $\mu$ l). In an Eppendorf tube, DLS

liposomes (38 or 25  $\mu$ l for SSOs or plasmid DNA (pDNA), respectively) were added to nucleic acids in 150 mM NaCl (37 or 50  $\mu$ l) to a final concentration of 45 or 60 mM NaCl. The mixture was gently mixed and incubated for 15 min at room temperature. We obtained a nucleic acids concentration of 80 mg/ml in complexes and a final lipid concentration of 1.5 or 1.0 mg/ml for ONs and pDNA, respectively. Ratios used were 80  $\mu$ g pDNA/mg lipid and 50  $\mu$ g ON/mg lipid, thus leading to lipoplexes with a global net positive charge ratio of 3.3 in both cases. Lipoplexes were kept at 4 °C until use and can be stored up to 2 months as previously described [24]. Complexes of SSO with Lipofectamine<sup>®</sup> reagent (Invitrogen SARL) were prepared according to the manufacturer's instructions.

## Particle size distribution analysis

Particle size was measured by dynamic light scattering using a Malvern 4800 Autosizer apparatus (Malvern Instruments, Orsay, France). Average diameters were evaluated as a Z-average using a monomodal method (a cumulant analysis). The intensity-based distributions were obtained in the Gaussian-fit mode using the 7132 digital correlator PCS software. Width (width at half peak height) is indicative of the homogeneity of size distribution.

## Transfection of cultured cells and reporter gene assays

Cells (2.5 to 3.5  $\times 10^5$ /well) were seeded in 6-well dishes with 10% FCS-containing medium. After overnight culture, the cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and the medium was replaced with 2 ml optiMEM or DMEM containing decomplexed serum (Invitrogen SARL). For 100 nM ONs, 15  $\mu$ l of lipoplexes (1.2  $\mu$ g of ON) were added to the cells and luciferase activity was monitored 24 or 48 h later. Each experiment was performed in triplicate.

Firefly luciferase activity was measured using a luciferase assay kit (Promega France). Following transfection and post-incubation, cells were rinsed twice with

**Table 1. Sequences and backbone modifications and target sites of the oligomers synthesized**

Oligomers	Sequence 5' 3'	Target site	Backbone
2'- <i>O</i> -Me SSO <sub>705</sub>	CCU CUU ACC UCA GUU ACA	705	2'- <i>O</i> -Me
2'- <i>O</i> -Me ON <sub>705M</sub>	CCU CUU ACA UCA GUU ACA		2'- <i>O</i> -Me
2'- <i>O</i> -Me SCR <sub>705</sub>	ACU ACC CGA UAU CUC CUC		2'- <i>O</i> -Me
2'- <i>O</i> -Me SSO <sub>623B</sub>	UUA UUC UUU AGA AUG GUG	623	2'- <i>O</i> -Me
2'- <i>O</i> -Me PS SSO <sub>705</sub>	CCU CUU ACC UCA GUU ACA	705	2'- <i>O</i> -Me, P=S
2'- <i>O</i> -Me PS SCR <sub>705</sub>	ACU ACC CGA UAU CUC CUC		2'- <i>O</i> -Me, P=S
2'- <i>O</i> -Me PS SSO <sub>623B</sub>	UUA UUC UUU AGA AUG GUG	623	2'- <i>O</i> -Me, P=S
2'- <i>O</i> -MOE SSO <sub>623A</sub>	TGT TAT TCT TTA GAA TGG	623	2'- <i>O</i> -MOE, P=S
2'- <i>O</i> -MOE SSO <sub>623B</sub>	TTA TTC TTT AGA ATG GTG	623	2'- <i>O</i> -MOE, P=S
2'- <i>O</i> -MOE SSO <sub>705</sub>	CCT CTT ACC TCA GTT ACA	705	2'- <i>O</i> -MOE, P=S
2'- <i>O</i> -MOE NS <sub>654-3MM</sub>	GCT ACT ACA TTA AAC CAG		2'- <i>O</i> -MOE, P=S
Morpholino SSO <sub>623</sub>	GTT ATT CTT TAG AAT GGT G	623	Morpholino
Morpholino NS <sub>654-3MM</sub>	GCT ACT ACA TTA AAC CAG		Morpholino

PBS. Reporter lysis buffer (Promega France) was then added to the cells. After 15 min incubation at room temperature, the cells were scraped from the culture plate and the cell homogenate (300  $\mu$ l) was placed in a 1.5 ml Eppendorf tube. Cell lysates were mixed vigorously in a vortex homogenizer, tubes were placed in ice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. After thawing, tubes were mixed vigorously and centrifuged for 30 s at 900 g. Luciferase activity in the supernatant was quantified with a Centro LB 960 luminometer (Berthold Technologies, Berthold France SA, Thoiry, France). The protein concentration in the extract was measured by the BCA<sup>TM</sup> protein assay kit (Pierce, Perbio Science France SAS, Brebieres, France) at 560 nm. Luciferase activity in cultured cells was expressed as relative light units (RLU) per  $\mu$ g of protein. Splice-correcting activities were compared either as total luciferase activity or as sequence-specific luciferase activity (values minus SCR or mismatched SSO). Each data point was averaged over three replicates.

### Flow cytometry

Cells ( $3.5$  to  $5 \times 10^5$ /well) were plated in 6-well dishes. After overnight culture, HeLa cells pLuc/705 were treated with free 5'-FITC-labelled ON or with lipoplexes obtained with SSO in optiMEM or in decomplexed serum-containing DMEM. Each experiment was performed in duplicate.

After 4 h incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ , cells were rinsed twice with PBS, dissociated with trypsin-EDTA (Gibco), centrifuged, resuspended in 300  $\mu$ l PBS, in polystyrene tubes, and kept on ice until analysis. Flow cytometry was performed by fluorescence activated cell sorting (FACS) (BD Biosciences France, Le Pont De Claix). Fluorescein green fluorescence intensity of 20 000 events was observed on the FL1 channel and recorded at 520 nm after excitation at 488 nm. Results were analyzed with WinMDI software.

### Epifluorescence microscopy of live cells

Cells ( $3 \times 10^5$ /well) were plated in 35 mm single wells. Following overnight culture, HeLa pLuc/705 cells were treated with lipoplexes obtained with 5'-FITC-labelled SSO in optiMEM or in decomplexed serum-containing DMEM. Living cells were directly observed in the dishes, in 1.5 ml of PBS supplemented with 5% FCS, after 4 to 24 h of transfection. Fluorescence distribution was analyzed on a Zeiss Axiovert 200M fluorescence microscope without fixation. Images were first acquired with AxioVision software. After exportation, images were finally superposed and analyzed with Adobe Photoshop software.

### Cytotoxicity assay

Cell viability and cytotoxicity studies were performed by plating HeLa pLuc/705 cells into 96-well plates at

$3 \times 10^4$  cells/well. Cells were incubated with lipoplexes for 24 h in optiMEM or in serum-containing decomplexed DMEM. Viable cells were counted using the trypan blue exclusion test (data not shown). The proportion of live cells was alternatively determined by the tetrazolium-based colorimetric cell proliferation assay (MTS, Promega France) by reading the absorbance at 560 and 630 nm. The amount of live cells was obtained by subtracting 560 and 630 nm values. Data are expressed as the percentage of cytotoxicity (relative to untreated cells).

### Statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analyses were performed using Student's test for comparison of means. A probability of less than 0.05 was considered to be statistically significant: \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

## RESULTS

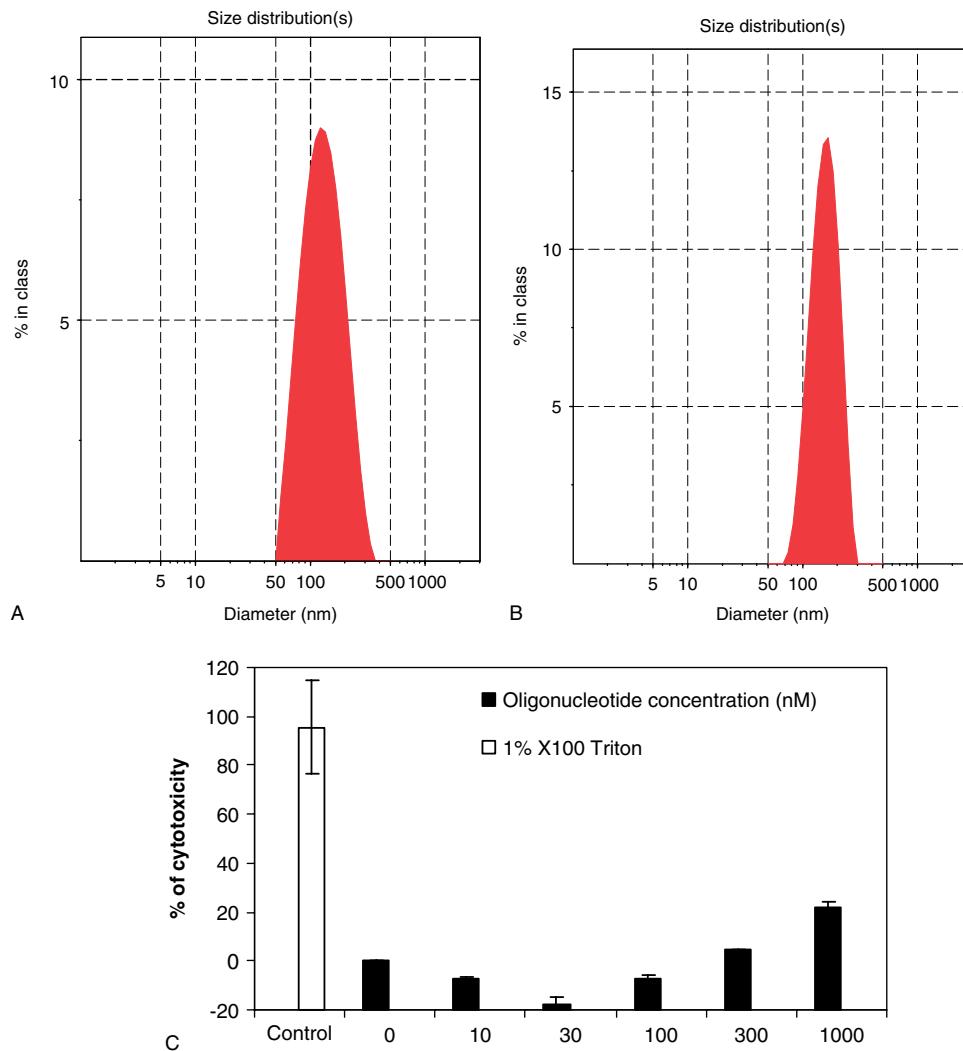
### Lipoplex preparation

SSOs formed stable particles of high homogeneity with the DLS liposomes. DLS liposomes (Figure 1A) and DLS/2'-O-Me SSO<sub>623</sub> (Figure 1B) exhibited a mean size of 137 nm (149 width) and 160 nm (117 width), respectively. No particles larger than 400 nm were detected in both samples. Particle size did not significantly vary over time.

A tetrazolium-based colorimetric assay showed that DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> did not significantly perturb HeLa pLuc/705 cell proliferation at concentrations lower than 1  $\mu$ M (Figure 1C). Similar data have been confirmed with the trypan blue exclusion assay which indicated that 3.8% of dead cells were detected at 1  $\mu$ M concentration (data not shown). In addition, no significant decrease in protein concentration in DLS-treated HeLa pLuc/705 cells compared to untreated cells was observed throughout this study when evaluating splicing correction levels.

### Correction of splicing alteration by 2'-O-Me SSO

We initially optimized conditions for employing the DLS system by measuring splicing correction by 2'-O-Me SSO<sub>705</sub> in the HeLa pLuc/705 cells [29]. In cells treated with 100 nM 2'-O-Me SSO<sub>705</sub> delivered with the DLS lipoplex and further incubated for 24 h in serum-containing medium, luciferase activity was increased by 10.7-fold over that in untreated cells (Figure 2A). Cells incubated with control 2'-O-Me SCR (scrambled) or 705M SSOs were unaffected; luciferase activity was only 1.1- and 1.3-fold higher, respectively, over untreated cells. There was no statistical difference between 2'-O-Me SCR and 705M SSOs ( $p > 0.05$ ) thus establishing the high sequence specificity of splicing correction (Figure 2A).



**Figure 1.** Characterization of DLS lipoplexes. Mean diameter of DLS particles as measured by dynamic light scattering. DLS liposomes (A) and DLS/2'-O-Me SSO<sub>623</sub> complexes (B) were prepared as described in the 'Material and methods' section at 80 mg/1.5 mg/ml of SSO and lipids concentration, respectively, in 45 mM NaCl. Average diameters were evaluated as a Z-average using intensity-based distributions (% in class). (C) Cytotoxicity in HeLa pLuc/705 cells by increasing concentrations of DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> in serum-containing cell culture medium for 24 h. ON concentrations complexed with the DLS are indicated. The level of cytotoxicity was determined by the tetrazolium-based colorimetric cell proliferation assay and expressed as percent of the cytotoxicity level in treated cells reported to that in non-treated cells. Control, cells incubated with 1% Triton X-100 as positive control

No activity was detected in HeLa pLuc/705 cells treated with free 2'-O-Me SSO<sub>705</sub> under the same experimental conditions (data not shown), indicating that delivery using the DLS was essential for the effect.

Figure 2B clearly demonstrated a time-dependent increase in the luciferase activity in HeLa pLuc/705 cells treated with 130 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub>. A 24 h incubation time period appeared optimal and was chosen in subsequent experiments and has also been described as optimal when using other experimental protocols for SSO administration [12,27].

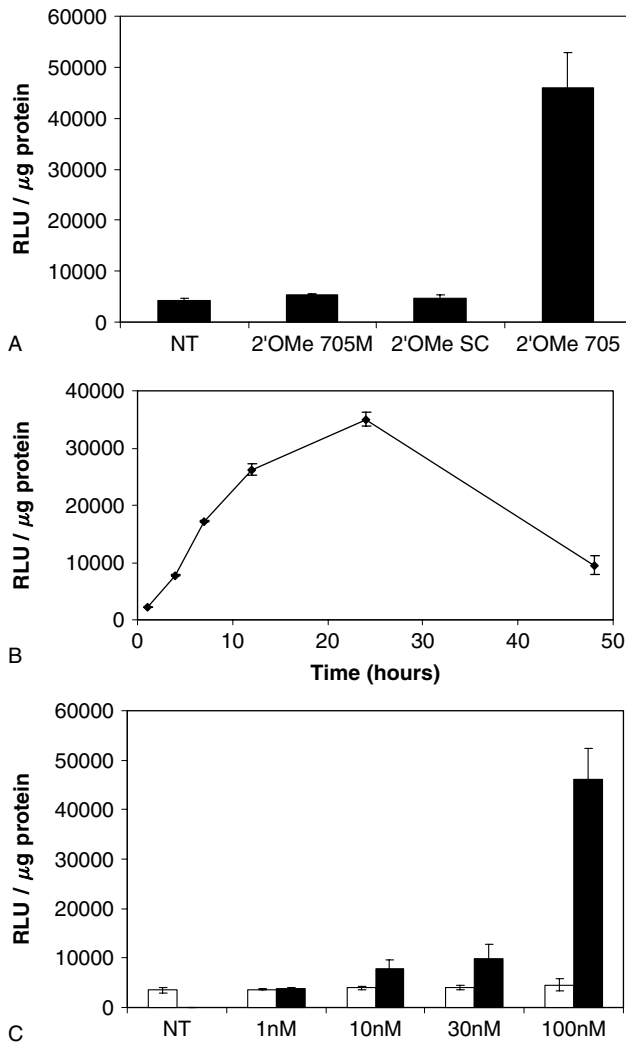
Dose-curve experiments showed statistically significant luciferase activity at concentrations as low as 10 nM. Luciferase activity increased up to 100 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> (Figure 2C), and levelled off at higher concentrations (data not shown). Cells treated with 100 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> exhibited 10.1- and 13.3-fold increases in

luciferase activity compared with SCR and untreated cells, respectively.

Optimal luciferase activity for DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> was observed for a formulation with 0.08 SSO/lipids (w/w) and 3.3 global net charge ratios (Figure 3A). In serum-containing media, in contrast to DLS particles, lipoplexes formed with 2'-O-Me SSO<sub>705</sub> and Lipofectamine® reagent (LFA) were not active at a concentration of 100 nM (Figure 3B). All subsequent experiments were carried out in 10% serum-containing cell culture medium.

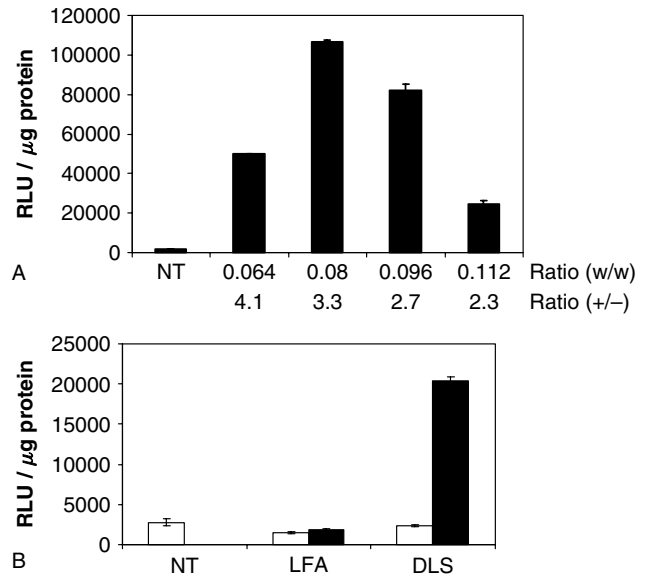
## Cellular uptake

The cellular uptake of DLS-associated FITC-labelled ONs was detectable by FACS analysis in HeLa cells



**Figure 2.** Splicing correction in the HeLa pLuc/705 cells by using DLS/2'-O-Me SSO. (A) Sequence specificity of the luciferase activity was evaluated by treating cells with 100 nM 2'-O-Me SSO<sub>705</sub>, 2'-O-Me SCR or 705M SSO delivered with the DLS lipoplex in serum-containing medium and further incubated for 24 h. NT, non-treated cells. (B) Time-course experiment was determined by incubating cells with 130 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> in optiMEM for the indicated times. (C) Dose-response was measured by treating cells for 24 h in serum-containing medium. Filled bars, luciferase activity determined following DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> treatment. Empty bars, luciferase activity determined following DLS/2'-O-Me SSO<sub>705M</sub> treatment. NT, non-treated cells. The activity of luciferase was normalized to total cellular protein and is presented in relative luminescence units (RLU) per  $\mu\text{g}$  of protein. Error bars show standard deviation ( $n = 3$ )

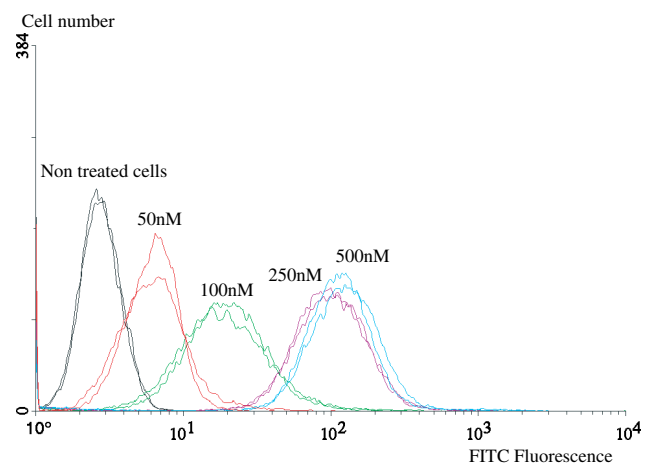
treated for 4 h with as little as 50 nM DLS/FITC-2'-O-Me SSO<sub>705</sub> (Figure 4). Cell-associated fluorescence intensity increased gradually up to a concentration of 250 nM. There is a discrepancy with dose-curve experiments as fluorescence increases up to 250 nM, whereas activity levels off at 100 nM. It suggests that cell-associated fluorescence could not directly be comparable to effective intracellular SSO concentration. There was no significant increase at 500 nM. When treating cells with 0.2 M glycine (pH 2.8) to ensure stripping off of membrane surface binding, it appears



**Figure 3.** (A) Optimization of DLS lipoplex formulation. 200 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> were prepared with varying SSO/lipid ratios and incubated with HeLa pLuc/705 cells in optiMEM. Preparations are defined either by their SSO/lipid ratios (w/w) or by their corresponding global net charge (+/-). NT, non-treated cells. (B) Comparison of the splice-correcting activity of 100 nM 2'-O-Me SSO<sub>705</sub> (filled bars) or SSO<sub>705M</sub> (empty bars) delivered either with the Lipofectamine<sup>®</sup> reagent (LFA) or with the DLS in 10% serum-containing cell culture medium for 24 h. NT, non-treated cells. Error bars show standard deviation ( $n = 3$ )

that around 80% of the cell fluorescence analyzed here corresponds to internalized FITC-labelled ON (data not shown).

Epifluorescence images of unfixed HeLa pLuc/705 cells incubated with 200 nM FITC-labelled 2'-O-Me SSO<sub>705</sub> delivered with the DLS are presented in Figure 5.



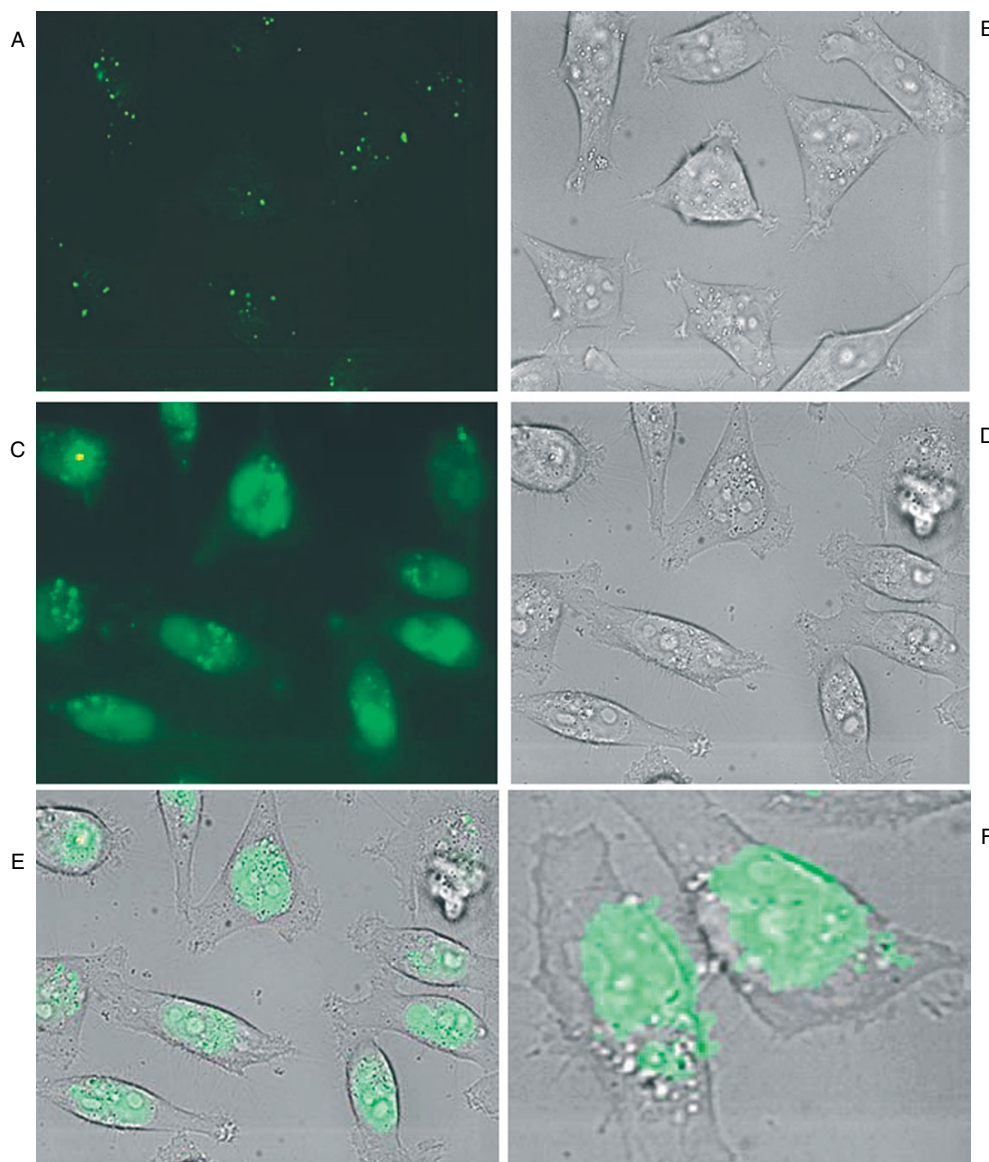
**Figure 4.** Cell association of 5'-FITC-labelled SSO delivered with the DLS lipoplexes. Following 4 h incubation in serum-containing culture medium, HeLa pLuc/705 cells were rinsed in PBS and subjected to flow cytometric analysis. Fluorescein green fluorescence intensity was determined in cells treated with increasing concentrations of DLS/5'-FITC-labelled SSO. Two samples were analyzed for each tested concentration

Following 2 h incubation, FITC (green fluorescence) labeled SSO was distributed nearly exclusively in small cytoplasmic vesicles (Figure 5A). This vesicular localization probably corresponds to endosomes since Alexa 546-labelled transferrin nearly completely co-localizes with the SSO (data not shown and [29]). After 6 h incubation, fluorescence mainly accumulated in the cell nuclei (Figures 5C–5F). This suggests a rapid and efficient escape of ON from the endosomes, its release in the cytosol and its concentration into the nucleus. Note that charged ONs have a nuclear tropism and rapidly localize in the nucleus after microinjection in the cytoplasm [30]. Maximal nuclear accumulation was observed after 12 h incubation and the overall fluorescence intensity decreased following 24 h incubation (data not shown). Free ONs poorly penetrated

in cells and mainly remained entrapped in endocytic vesicles (data not shown).

### Comparative study of various SSO backbones and sequences

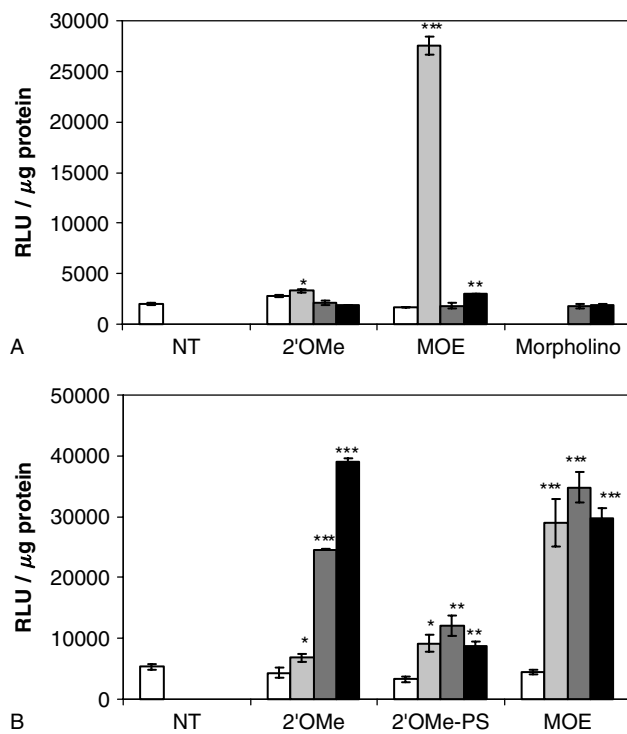
In this study we have used SSO<sub>623</sub> targeted to the splicing enhancer region at nucleotide position 623 of intron 2 (IVS2) of human  $\beta$ -globin pre-mRNA. Treatment of HeLa pLuc/705 cells with free 2'-O-Me and morpholino SSO<sub>623</sub> (Figure 6A) or 2'-O-Me PS SSO<sub>623B</sub> (data not shown) did not show any significant effects. Treatment with free MOE PS and morpholino SSOs promoted a slight but statistically significant production of luciferase luminescence ( $p \leq 0.01$ ). When delivered



**Figure 5.** Epifluorescence images of unfixed HeLa pLuc/705 cells incubated with 200 nM FITC-labeled 2'-O-Me SSO<sub>705</sub> delivered with the DLS. Living cells were directly observed in PBS supplemented with 5% FCS, after 2 h (A, B) or 6 h (C–F) incubation. Images of cells observed under green epifluorescence (A, C), visible light (B, D) and under superposition of green epifluorescence and visible light (E, F). (A) and (B) on the one hand as well as (C), (D) and (E) on the other are images of the same field of microscopical observation. All images are presented with 160 $\times$  magnification except image (F) (320 $\times$ )

with the DLS, MOE PS SSO<sub>623B</sub> generated 25-fold more specific luciferase activity (relative to SCR MOE ON) than in the free form (Figure 6A).

The influence of backbone chemistry was further compared with DLS-delivered SSOs targeted to two different but adjacent sequences, which both play a role in the same splicing event. When targeted to the 623B sequence, MOE PS SSO appeared to be far more active than 2'-O-Me or 2'-O-Me PS SSOs (Figures 6A and 6B). When targeting the 705 sequence, 2'-O-Me SSO<sub>705</sub> was as effective as MOE PS, and 2'-O-Me PS SSO was poorly active (Figure 6B). For either target, 2'-O-Me PS SSO corrected splicing less efficiently than 2'-O-Me and MOE PS SSOs. The MOE PS SSO analogue was slightly but systematically more potent than the 2'-O-Me SSO, and its activity was similar when targeting 623B or 705 sequences (Figure 6B). These results were confirmed in more than three independent experiments.

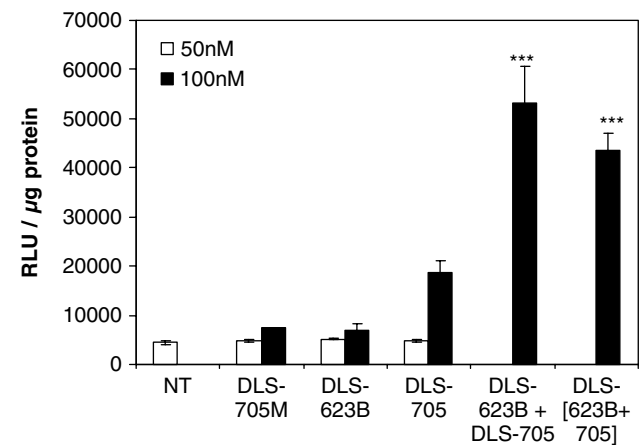


**Figure 6.** Comparative study of various SSO chemistries and sequences. (A) HeLa pLuc/705 cells were treated with 100 nM 623B directed SSO sequence synthesized with various chemistries: 2'-O-Me, 2'-O-Me PS, MOE and morpholino at 100 nM concentration for 24 h. Splice-correcting activity was measured following incubation with free SSO (black column), free SCR or NS (dark gray column), DLS-delivered SSO (gray column), and DLS-delivered SCR or NS (white column). (B) Comparison of steric-blocking activity of the 623B and 705 sequences synthesized with various chemistries (2'-O-Me, 2'-O-Me PS and MOE) delivered with the DLS. HeLa pLuc/705 cells were treated for 24 h with 100 nM SCR or NS (empty column); 100 nM SSO<sub>623B</sub> (light gray column); 100 nM SSO<sub>705</sub> (dark gray column), 50 nM SSO<sub>623B</sub> + 50 nM SSO<sub>705</sub> (filled column). NT, non-treated cells. Error bars show standard deviation ( $n = 3$ ). Statistical differences between RLU/ $\mu\text{g}$  values from scrambled and SSO-treated cells were evaluated: \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$

Figure 6B also compares the correcting activity of SSOs with different backbones targeted to 623B and 705 regions. SSO<sub>705</sub> with a 2'-O-Me modification increased luciferase activity 6-fold and sequence-specific activity 12-fold more than SSO<sub>623B</sub>. With the 2'-O-Me PS chemistry, SSO<sub>705</sub> and SSO<sub>623B</sub> were similarly effective. The same observation was made for MOE SSO<sub>705</sub> and SSO<sub>623B</sub>, although much higher activities were observed, in comparison with 2'-O-Me PS analogues as previously described. MOE SSO<sub>623A</sub>, which differs by a single nucleotide from MOE SSO<sub>623B</sub> (Table 1), was 1.5-fold less effective than MOE SSO<sub>623B</sub> ( $p < 0.05$ ) (data not shown), despite full sequences hybridizing to the RNA target.

### Targeting simultaneously 705 and 623B sites

When co-treating the cells with 50 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> and 50 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>623B</sub>, total luciferase activity was at least 4-fold higher (Figure 7) than expected. Indeed luciferase activity should in theory be between values obtained with 100 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> and with 100 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>623B</sub> (Figure 7). Likewise, the co-encapsulation within DLS lipoplexes made of a mix of 2'-O-Me SSO targeting 623B and 705 sequences at 100 nM total SSO concentration led to a luciferase activity 3-fold higher than obtained with 100 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> or 100 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>623B</sub> (Figure 7). Surprisingly, there was no increasing effect in combining 705 and 623B sequences when using either 2'-O-Me PS or MOE analogues (Figure 6B, filled bars).



**Figure 7.** Effect of targeting simultaneously 705 and 623B regions in HeLa pLuc/705 cells. Cells were incubated for 24 h with 50 nM (empty column) or 100 nM DLS delivered 2'-O-Me SSO (filled column). Luciferase activity was assayed in cells treated with 100 nM DLS/SSO<sub>705M</sub> control sequence, 100 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>623B</sub>, 100 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub>, 50 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> plus 50 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>623B</sub>, and 100 nM of DLS lipoplex made of a equivalent mix of 2'-O-Me SSO<sub>623B</sub> and 2'-O-Me SSO<sub>705</sub>. NT, non-treated cells. Error bars show standard deviation ( $n = 3$ )



## Switching on transgene expression by steric-blocking SSOs

SSO activity was evaluated here for its ability to correct splicing and as a consequence to allow luciferase expression from episomal plasmid DNA containing the IVS2 $\beta$ -globin 705 intron mutation. Thus, wild-type HeLa cells were first transfected with DLS/pLuc705 pDNA, incubated for 24 h and further incubated for 24 h with the splice-correcting SSO (Figure 8A). Both pDNA and splice-correcting SSO were delivered with DLS lipoplexes. Optimal luciferase activity was reached with 200–300 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub>. RLU/ $\mu$ g protein values obtained following treatment with 100 or 200 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> were 3.3- and 7.7-fold higher than those obtained with SCR SSO at 100 and 200 nM, respectively (Figure 8A). Incubation with 50 nM leads to a detectable but not statistically significant ( $p = 0.26$ ) increase, suggesting as well a dose-dependent effect of the splice-correcting SSO on the modulation of transgene expression.

However, total luciferase activity levels were 5- to 7-fold lower than previously observed in SSO-treated HeLa pLuc/705 cells. Moreover, the luciferase activity obtained following 500 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> treatment was lower indicating toxicity at this dose. When cells were not treated with SSO following pDNA transfection, luciferase activity was detectable but similar to that obtained with 2'-O-Me SCR SSO. This reveals that pLuc/705 leads to a basal constitutive expression of luciferase as previously observed [27].

Incubation times for both the transfections of DLS/pLuc705 and of 200 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> were optimized (Figure 8B). A 24 h treatment of cells with DLS/pLuc705 followed by a 24 h treatment with DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> was found optimal to achieve efficient luciferase expression. Similar effects on specific luciferase activity were observed when transfecting cells with either 2 or 3  $\mu$ g pLuc/705 plasmid per well. Post-incubation with 200 nM DLS/MOE SSO<sub>705</sub> or DLS/MOE SSO<sub>623A</sub> leads to similar luciferase activity (10.7- and 12.0-fold higher than in cells treated with 705M control ON with no statistical difference) (Figure 8C). An 18.8-fold increase in luciferase expression was obtained with 200 nM DLS/MOE SSO<sub>623B</sub>. For the MOE SSO analogue, the 623B sequence was routinely more active than the 623A ( $p = 0.0008$ ) or 705 sequences ( $p = 0.0018$ ) in inducing luciferase expression in pLuc/705-transfected cells. Splice correction was statistically significant with the three MOE analogues ( $p < 0.001$ ) in comparison with pLuc/705 only (Figure 8C).

Targeting simultaneously 705 and 623B target sites was also used to correct splicing alteration from the episomally expressed pLuc/705 plasmid in transfected HeLa cells (Figure 8D). Cell treatment with a combination of 50 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> plus 50 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>623B</sub> or 100 nM of DLS lipoplex made of a equivalent mix of 2'-O-Me SSO<sub>623B</sub> and 2'-O-Me SSO<sub>705</sub> led to luciferase activity statistically higher than that obtained in cells

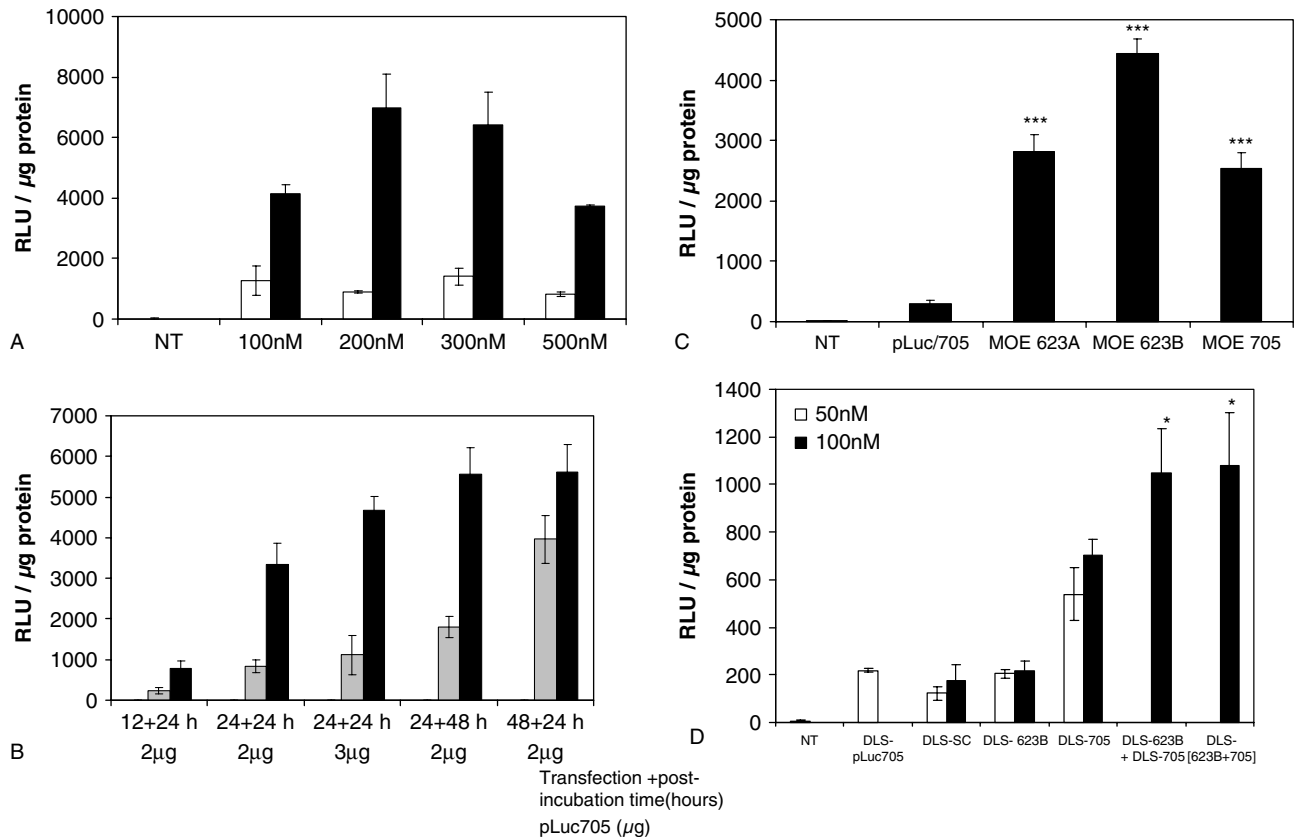
treated with 100 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 8D). As previously observed when using HeLa cells stably expressing the IVS2 construct (Figures 6A and 7), treatment with DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> promoted higher splicing correction than treatment with DLS/2'-O-Me SSO<sub>623B</sub>. It is interesting to note that a similar splice-correcting activity profile is obtained either using the transformed HeLa pLuc/705 cells or the transiently transfected HeLa cells. When simultaneously treating cells with 623B and 705 SSO sequences, data reveals that the MOE analogues were more potent than 2'-O-Me or 2'-O-Me PS analogues for switching on luciferase expression (data not shown). This was also shown above when using the HeLa pLuc/705 cell experimental model.

## Discussion

Here, we used an efficient ON delivery system to directly compare the intracellular efficacy of various SSO backbones and sequences for correcting splice aberration. Use of the DLS lipoplex makes it possible to detect splice correction in the HeLa pLuc/705 cells treated in serum-containing medium.

Several synthetic vectors were explored for the administration of SSOs. Conjugation with basic peptides was reported to improve the SSO activity [11] but entrapment within endocytic vesicles remains a limiting factor [31]. Polymers forming polyplexes with nucleic acids were used in a few studies, as for example PANAM dendrimers [32] or polyethyleneimine (PEI) [12], but *in vivo* toxicity was observed. The use of the triblock copolymer F127 for the intramuscular administration of 2'-O-methyl phosphorothioated SSOs was described to efficiently restore dystrophic expression in skeletal muscles [18]. Lipoplexes remain to date the most employed tools to deliver ONs. Splicing correction was achieved with 2'-O-methyl phosphorothioated SSO delivered with the Lipofectamine<sup>®</sup> reagent (LFA) [8,11,15]. However, most commercially available delivery systems suffer from instability and serum-free medium is therefore recommended for transfection. Systemic administration of lipoplex for ON delivery is, consequently, poorly documented in the literature. Local administration such as intramuscular injection was successfully used for the delivery of 50  $\mu$ g/kg leash (partially hybridized with charged oligonucleotides) morpholino with the Lipofectin system (Invitrogen SARL) in *mdx* mice [33]. Annealing leash SSOs to the neutrally charged morpholino leads to negatively charged SSOs making possible the formation of lipoplexes. It has to be indicated here that authors mentioned that the toxicity of those delivery systems significantly limited their *in vivo* use [12,34].

As previously described [20,22], the DLS makes possible the formation of stable, reproducible particles of low and homogenous size with nucleic acids. These particles show a specific highly ordered ultrastructure of liquid crystal in a lamellar phase [35]. Formation



**Figure 8.** Switching on transgene expression in HeLa cells transiently expressing luciferase by steric-blocking SSOs. HeLa cells were transfected with the plasmid DNA containing the IVS2  $\beta$ -globin 705 mutated intron inserted in the luciferase gene using the DLS vector. Following incubation for 24 h cells were further treated for 24 h with SSO. Luciferase activity was determined as described in the 'Materials and methods' section. (A) Dose-curve experiment when using DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> (filled column) and DLS/2'-O-Me SCR SSO (empty column). (B) Study of the optimal conditions for switching on functional luciferase expression. Cells were transfected with DLS/pLuc705 (2 or 3  $\mu$ g DNA) for 12, 24 or 48 h and then incubated for 24 or 48 h with DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> (black column) or DLS/2'-O-Me SCR SSO (gray column). (C) Switching on transgene expression by MOE SSO. Following transfection with DLS/pLuc705 for 24 h, HeLa cells were incubated for 24 h with 200 nM DLS/MOE SSO<sub>623A</sub>, DLS/MOE SSO<sub>623B</sub> or DLS/MOE SSO<sub>705</sub>. Statistical differences between RLU/ $\mu$ g values from only pLuc/705- and SSO-treated cells were evaluated: \*\*\* $p \leq 0.001$ . (D) Effect of targeting simultaneously 705 and 623B regions. Cells were incubated for 24 h with 50 nM (empty column) or 100 nM DLS-delivered 2'-O-Me SSO (filled column). Luciferase activity was assayed in cells treated with 100 nM DLS/SSO SCR, 100 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>623B</sub>, 100 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub>, 50 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> plus 50 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>623B</sub>, and 100 nM of DLS lipoplexes made of a equivalent mix of 2'-O-Me SSO<sub>623B</sub> and 2'-O-Me SSO<sub>705</sub>. Statistical differences between RLU/ $\mu$ g values from 100 nM DLS/2'-O-Me SSO<sub>705</sub> treated cells and cells treated with both 2'-O-Me SSO<sub>623B</sub> and 2'-O-Me SSO<sub>705</sub> sequences at 100 nM equivalent concentration were evaluated: \* $p \leq 0.05$ . NT, non-treated cells. Error bars show standard deviation ( $n = 3$ )

of these lipoplex particles appears as an emergent process which might lead to a auto-organized complex system [36]. Controlling the thermodynamic parameters of the formation of these lipoplexes and optimizing their formulation toward obtaining fully ordered particles is a prerequisite in obtaining high levels of nucleic acid delivery and activity. DLS/SSOs were shown here to be non-toxic to cultured cells at optimal concentrations and to be very efficient at restoring correct splicing in HeLa pLuc/705 cells.

DLS efficiency appears to be originating from first the high SSO activity observed and second from their biological stability. Here, we show that SSO activity was significantly detectable at concentrations as low as 10 nM even in serum-containing medium. Splicing correction was not detectable under these conditions when the SSO was delivered with LFA. Accordingly, LFA delivery was

used either without serum or with optiMEM in this splicing correction assay and luciferase activity was detected at an SSO concentration of 30 nM [27]. The high SSO potency observed here in serum-containing medium confirmed our previous data where IC<sub>50</sub> levels ranged within nanomolar concentrations when monitoring antisense activity [7,22]. In order to bind RNA targets, SSOs must enter the nucleus where correction of splicing will occur. As observed here, the DLS vector effectively penetrates into cells by endocytosis but cytosol release and nuclear accumulation efficiently occur within a few hours.

Delivery using the DLS made possible the direct comparison of the splice-correcting activity of SSOs varying in terms of backbone chemistry or target sequences. MOE ONs were more active than 2'-O-methyl ONs, thus confirming the results of Sazani *et al.* [9,11]. When directed to the 623 region, 2'-O-Me PS



SSO had a slight but statistically significant higher activity than 2'-O-Me SSO. In contrast, 2'-O-Me SSO<sub>705</sub> promoted a high level of splice-correcting activity comparable to 2'-O-MOE. This might be explained by the fact that the phosphorothioate modification, considered to normally stabilize SSOs [33], reduces their affinity for this specific target sequence. Interestingly, a low but statistically significant correction of splicing was detected with free MOE and morpholino SSO in serum-containing medium while free 2'-O-Me derivatives were not active. Accordingly, 2'-O-methyl MOE and uncharged morpholino SSO showed to be the more efficient SSOs *in vivo* [11]. It was previously demonstrated that injection of 2'-O-MOE in mice was more active than morpholino in most tissues but in skeletal muscle morpholino was equal or possibly better [11]. This may explain the high value of exon skipping in muscle cells described in the very recent reports when administering morpholino SSO in a free form [18,19,34]. DLS-delivered 2'-O-MOE induced a far greater splicing correction in our *in vitro* assay than free MOE or morpholino SSO suggesting the potential role of this delivery vector for further *in vivo* applications.

The HeLa pLuc/705 cell culture model was used to investigate putative activity of steric-blocking SSOs to treat  $\beta$ -thalassemia [27].  $\beta$ -Thalassemia is a serious genetic blood disorder in which production of  $\beta$ -globin, a subunit of hemoglobin, is partially or entirely ablated by mutations in the  $\beta$ -globin gene. Mutations that cause splicing defects are common among thalassemic patients. For example, mutations at positions 654, 705, or 745 of intron 2 (IVS2) of human  $\beta$ -globin pre-mRNA lead to creation of an aberrant 5' splice site and activation of a cryptic 3' splice site within the intron. The result is the inclusion of part of IVS2 (creating an in-frame stop codon) into the spliced mRNA. HeLa pLuc/705 cells contain, within the luciferase gene, IVS2 which include the aberrant splice site created in thalassemic patients by a T to G mutation at nucleotide 705 [19]. In addition, Gemignani *et al.* [28] demonstrated that there must be an important splicing signal upstream at position 623. This sequence behaves as a splicing enhancer because its insertional disruption interferes with splicing. Accordingly, targeting this region with an SSO interferes with aberration and restores correct splicing of the IVS2-705 thalassemic  $\beta$ -globin pre-mRNA (Gemignani and Kole, unpublished). It was postulated that when the donor 5' splice site at a mutated region (705 or 654) is shifted beyond a critical distance from this signal, splicing no longer occurs [28]. We confirm here that SSO<sub>623</sub> is effective in restoring correct splicing and that it could be as potent as SSO<sub>705</sub> in particular when synthesized with the MOE chemistry. Moreover, we demonstrated that targeting two different regions (e.g. sequences 623 and 705) in the same  $\beta$ -globin pre-mRNA intron enhances splicing correction. However, this has been observed only with 2'-O-Me SSO. Nevertheless, it would be of interest to evaluate again this multi-targeting approach in a different experimental model aimed, for instance, at correcting the 654 region [19], or in an *in vivo* setting [10,11].

Pharmacological considerations are of importance when considering the therapeutic use of SSOs. Significant progress has been described in the treatment of Duchenne muscular dystrophy by exon skipping [12]. 2'-O-Methyl ribonucleotides [18] and morpholino [35] analogues were administered by systematic routes and were found to restore dystrophin expression in body-wide skeletal muscle by using the block co-polymer F127 as a delivery agent. Alter *et al.* [19] recently reported that weekly intravenous injections of free morpholino SSO induce expression of functional levels of dystrophin in body-wide skeletal muscles of the dystrophic *mdx* mouse. However, high doses of morpholino SSO (100 mg/kg) had to be administered [19] with associated problems of cost and potential toxicity. Likewise, *ex vivo* correction of  $\beta$ -globin pre-mRNA was accomplished in human erythroid progenitor cells [7] but splicing correction required high doses (45  $\mu$ M). In an alternative and potentially longer-term strategy, the antisense sequences were incorporated into lentiviral [35] or AAV (adeno-associated virus) [37] expression vectors and found efficient for the delivery of splice-correcting SSOs in erythropoietic progenitors or muscle cells, respectively. These impressive data should not mask however difficulties which would be encountered in scaling up and more importantly safety considerations. Non-viral delivery vectors are therefore worth further evaluation as an alternative strategy. Use of the EGFP-654 transgenic mouse model [11,29] will hopefully allow defining whether the DLS formulation leads to efficient splicing correction in various organs after systemic *in vivo* administration.

We suggest that splice-correcting SSOs might be used for switching on or for modulating the expression of a transgene. Integrated or episomal expression of a specific transgene of interest (such as the luciferase reporter gene tested here) might be regulated upon administration of a steric-blocking SSO. Indeed, the expression of heterologous genes in mammalian cells or organisms for therapeutic or experimental purposes often requires tight control of transgene expression [38]. Specifically, the following criteria should be met: no background gene activity in the off-state, high gene expression in the on-state, regulated expression over an extended period, and multiple switching between on- and off-states [39,40]. Turning on gene expression at a post-transcriptional step as described here might thus be an alternative to the use of conditional promoters such as the tetracycline-regulated ones. The regulation of transgene expression by exogenously or endogenously driven controllable promoters might be limited by the potential disturbance in the expression of endogenous genes [41]. It might be speculated that the approach of switching on the expression of a transgene through an SSO could lessen those drawbacks, owing to their highly specific mechanism of action. Using the same vector to vectorize the transgene, and subsequently the SSO, might ensure more effective targeting since DLS particles delivering pDNA or oligonucleotides are similar in size and ultrastructure [35], and consequently distribute similarly

in the body following *in vivo* administration. A gene therapy approach using the same synthetic vector for the delivery of a therapeutic transgene as well as of an SSO might provide better spatial, temporal and quantitative control of gene expression.

## Acknowledgements

This work was supported by EC framework 5 (contract QLK3-CT-2002-01989). S. Resina had a pre-doctoral fellowship thanks to ID VET (Montpellier, France). We thank Paul Prevot for his expertise in fluorescence microscopy.

## References

- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002; **3**: 285–298.
- Sazani P, Kole R. Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing. *J Clin Invest* 2003; **112**: 481–486.
- Garcia-Blanco MA, Baraniak AP, Lasda EL. Alternative splicing in disease and therapy. *Nat Biotechnol* 2004; **22**: 535–546.
- Tazi J, Durand S, Jeanteur P. The spliceosome: a novel multifaceted target for therapy. *Trends Biochem Sci* 2005; **30**: 469–478.
- Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1489**: 31–44.
- Thierry AR, Vives E, Richard JP, et al. Cellular uptake and intracellular fate of antisense oligonucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 2003; **5**: 133–138.
- Lavigne C, Yelle J, Sauve G, Thierry AR. Is antisense an appropriate nomenclature or design for oligodeoxynucleotides aimed at the inhibition of HIV-1 replication? *AAPS PharmSci* 2002; **4**: E9.
- Lacerra G, Sierakowska H, Carestia C, et al. Restoration of hemoglobin A synthesis in erythroid cells from peripheral blood of thalassemic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 9591–9596.
- Sazani P, Kang SH, Maier MA, et al. Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 3965–3974.
- Suwanmanee T, Sierakowska H, Lacerra G, et al. Restoration of human beta-globin gene expression in murine and human IVS2-654 thalassemic erythroid cells by free uptake of antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol* 2002; **62**: 545–553.
- Sazani P, Gemignani F, Kang SH, et al. Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues. *Nat Biotechnol* 2002; **20**: 1228–1233.
- Van Deutekom JC, Bremmer-Bout M, Janson AA, et al. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 1547–1554.
- Wilton SD, Lloyd F, Carville K, et al. Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides. *Neuromuscul Disord* 1999; **9**: 330–338.
- Lu QL, Mann CJ, Lou F, et al. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 2003; **9**: 1009–1014.
- Aartsma-Rus A, Kaman WE, Bremmer-Bout M, et al. Comparative analysis of antisense oligonucleotide analogs for targeted DMD exon 46 skipping in muscle cells. *Gene Ther* 2004; **11**: 1391–1398.
- Dillman J, Palma E, Sazani P, Orum H, Cho M, Kole R. Efficient and persistent splice switching by systemically delivered LNA oligonucleotides in mice. *Mol Ther* 2006; **14**: 471–475.
- Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, et al. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* 1997; **8**: 511–512.
- Lu QL, Rabinowitz A, Chen YC, et al. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 198–203.
- Alter J, Lou F, Rabinowitz A, et al. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med* 2006; **12**: 175–177.
- Thierry AR, Lunardi-Iskandar Y, Bryant JL, Rabinovich P, Gallo RC, Mahan LC. Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 9742–9746.
- Liszewicz J, Sun D, Weichold FF, et al. Antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate complementary to Gag mRNA blocks replication of human immunodeficiency virus type 1 in human peripheral blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 7942–7946.
- Lavigne C, Thierry AR. Enhanced antisense inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in cell cultures by DLS delivery system. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **237**: 566–571.
- Lavigne C, Lunardi-Iskandar Y, Lebleu B, Thierry AR. Cationic liposomes/lipids for oligonucleotide delivery: application to the inhibition of tumorigenicity of Kaposi's sarcoma by vascular endothelial growth factor antisense oligodeoxynucleotides. *Methods Enzymol* 2004; **387**: 189–210.
- Thierry AR, Rabinovich P, Peng B, Mahan LC, Bryant JL, Gallo RC. Characterization of liposome-mediated gene delivery: expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA. *Gene Ther* 1997; **4**: 226–237.
- Aksentijevich I, Pastan I, Lunardi-Iskandar Y, Gallo RC, Gottesman MM, Thierry AR. In vitro and in vivo liposome-mediated gene transfer leads to human MDR1 expression in mouse bone marrow progenitor cells. *Hum Gene Ther* 1996; **7**: 1111–1122.
- Baudard M, Flotte TR, Aran JM, et al. Expression of the human multidrug resistance and glucocerebrosidase cDNAs from adeno-associated vectors: efficient promoter activity of AAV sequences and in vivo delivery via liposomes. *Hum Gene Ther* 1996; **7**: 1309–1322.
- Kang SH, Cho MJ, Kole R. Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry* 1998; **37**: 6235–6239.
- Gemignani F, Landi S, DeMarini DM, Kole R. Spontaneous and MNNG-induced reversion of an EGFP construct in HeLa cells: an assay for observing mutations in living cells by fluorescent microscopy. *Hum Mutat* 2001; **18**: 526–534.
- Thierry AR, Abes S, Resina S, et al. Comparison of basic peptides- and lipid-based strategies for the delivery of splice correcting oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1758**: 364–374.
- Leonetti JP, Mechti N, Degols G, Gagnor C, Lebleu B. Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 2702–2706.
- Abes S, Williams D, Prevot P, Thierry AR, Gait MJ, Lebleu B. Endosome trapping limits the efficiency of splicing correction by PNA-oligolysine conjugates. *J Control Release* 2006; **110**: 595–604.
- Yoo H, Sazani P, Juliano RL. PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense oligonucleotides. *Pharm Res* 1999; **16**: 1799–1804.
- Gebbski BL, Errington SJ, Johnsen RD, Fletcher S, Wilton SD. Terminal antisense oligonucleotide modifications can enhance induced exon skipping. *Neuromuscul Disord* 2005; **15**: 622–629.
- Fletcher S, Honeyman K, Fall AM, Harding PL, Johnsen RD, Wilton SD. Dystrophin expression in the mdx mouse after localised and systemic administration of a morpholino antisense oligonucleotide. *J Gene Med* 2006; **8**: 207–216.
- Schmutz M, Durand D, Debin A, Palvadeau Y, Etienne A, Thierry AR. DNA packing in stable lipid complexes designed for gene transfer imitates DNA compaction in bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 12293–12298.
- Thierry AR, Durand D, Schmutz M, Lebleu B. DNA supramolecular self assemblies as a biomimetic complex system. In *Emergent Properties in Natural and Artificial Dynamical Systems*, Aziz-Alaoui MA, Bertelle C (eds). Springer: Heidelberg, 2006.
- Goyenvall A, Vulin A, Fougerousse F, et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004; **306**: 1796–1799.
- Rolland A. Gene medicines: the end of the beginning? *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; **57**: 669–673.

39. Ting DT, Kyba M, Daley GQ. Inducible transgene expression in mouse stem cells. *Methods Mol Med* 2005; **105**: 23–46.
40. Goverdhanna S, *et al.* Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther* 2005; **12**: 189–211.
41. Dulak J, Zagorska A, Wegiel B, Loboda A, Jozkowicz A. New strategies for cardiovascular gene therapy: regulatable pre-emptive expression of pro-angiogenic and antioxidant genes. *Cell Biochem Biophys* 2006; **44**: 31–42.

**ARTICLE III**

**« Inhibition de l'expression de PAI-I dans les cellules du  
carcinome du cancer du sein, par des concentrations  
nanomolaires de siRNA »**

Biochimie

Volume **89**(10):1228-1233, 2007

## I. INTRODUCTION.

Outres les ON simple-brin, les formulations de DLS ont aussi été développées et optimisées pour la délivrance d'ON double-brin : les siRNA. Ici, le but de cette délivrance est non plus de rendre une protéine fonctionnelle comme dans la correction de l'épissage, mais au contraire d'éteindre un gène donné en ciblant directement son ARNm. Cette stratégie interférence, ayant des similitudes avec la stratégie antisens « classique », a cependant la particularité de former un hétéroduplexe avec l'ARNm reconnu et dégradé immédiatement par le complexe RISC, qui dégradera ensuite tous les ARNm similaires dans la cellule, d'où l'effet d'extinction.

PAI-1 est très impliqué dans les processus de thrombose, mais aussi d'angiogénèse, d'adhésion et de migration des cellules tumorales. Des travaux récents du laboratoire (Hecke *et al.* 2006) avaient permis de choisir une séquence parmi 5, intéressante et très efficace d'un siRNA (siRNA #3), *in vitro* dans un modèle humain de cellules vasculaires HUVEC et HASMC. Plusieurs lignées cellulaires du cancer du sein étaient disponibles et notre intérêt s'est focalisé sur les cellules MDA-MB-231, une lignée très invasive et exprimant de forts taux de protéines PAI-1. Le challenge pour éteindre le gène PAI-1 était d'autant plus important. Ces travaux sont donc la démonstration de l'utilisation des siRNA anti-PAI-1 dans une stratégie anticancéreuse.

Les formulations de DLS ont été développées pour la délivrance de siRNA anti-PAI-1. Ces ON étant double-brin, les formulations adaptées ont donc été mises au point avec 2 fois moins (en rapport massique) d'AN efficaces pour la même quantité de lipides cationiques. Pour contrôle, un duplexe de siRNA « contrôle négatif universel » (Eurogentec), aussi appelé NS (non sens) a été utilisé.

L'activité de PAI-1 a été évaluée à plusieurs niveaux :

- ◆ ELISA : mesure de la protéine PAI-1 sécrétée par les cellules dans le milieu (quantitatif),
- ◆ RT-PCR quantitative : mesure de l'ARNm PAI-1 présent dans le noyau et le cytoplasme des cellules (quantitatif),
- ◆ western-blot : observation de la protéine intracellulaire (qualitatif).

Ces 3 techniques nous ont permis de comparer les taux de protéines, sécrétée et intracellulaire, ainsi que le taux d'ARNm de PAI-1 obtenus après transfection avec les DLS-siRNA.

## **II. CONTRIBUTION.**

Dans cet article, les résultats obtenus sont le fruit du stage d'un étudiant de MASTER que j'ai encadré, Matthieu MERYET-FIGUIERES. J'ai procédé à la mise au point de la technique ELISA visant à mesurer la protéine PAI-1 ainsi qu'à l'optimisation de la délivrance des siRNA avec son aide. J'ai aussi réalisé les formulations à base de DLS qui ont été utilisées et qui ont permis l'obtention de l'ensemble de ces résultats.

## **III. CONCLUSION.**

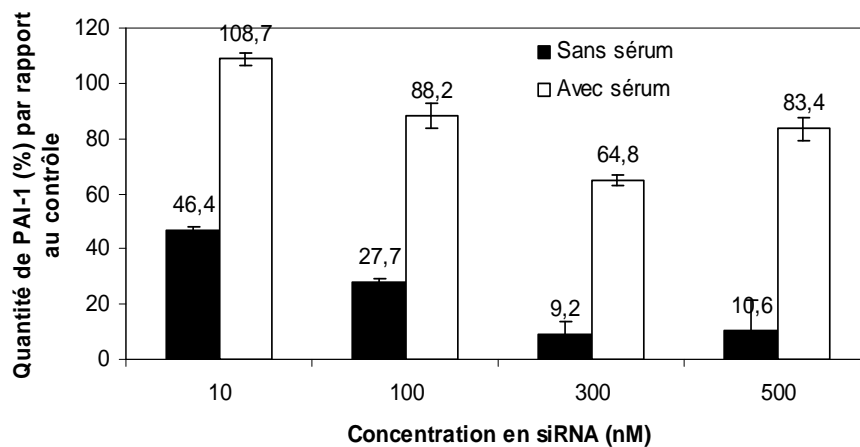
Les formulations de lipoplexes mises au point avec les siRNA montrent une répartition très homogène et monomodale des particules, avec un diamètre supérieur aux particules obtenues avec des ON simple-brin. Ces lipoplexes sont efficaces même en présence de sérum dans le milieu, en comparaison avec le lipide commercial utilisé (LFA).

La transfection avec 300nM de DLS-siRNA anti-PAI-1 provoquent une extinction de (voir Figure 33) :

- 89% de l'ARNm en milieu sans sérum
- 91% de la protéine sécrétée en milieu sans sérum
- 39% de l'ARNm en milieu avec 10% de sérum (données non publiées)
- 35% de la protéine sécrétée en milieu avec 10% de sérum (données non publiées)
- les images de western-blot sont en concordance avec ces résultats.

Les taux obtenus d'extinction des protéines et de l'ARNm sont donc en totale adéquation. Mais le taux d'extinction du gène sont fortement dépendants de la présence ou non de sérum : les particules de lipoplexes DLS-siRNA sont donc en partie inhibées par la présence de protéines sériques dans le milieu de transfection.

**Figure 33** : extinction de la protéine PAI-1 sécrétée obtenue en présence (en blanc) ou en absence (en noir) de sérum dans le milieu de transfection. Résultats obtenus après 48h de transfection puis analysés par ELISA.



L'extinction maximale est obtenue avec 300nM de siRNA et un temps de transfection de 24 à 48H. Cependant, des effets significatifs ont été observés à partir de 1nM de siRNA, au niveau de la protéine sécrétée, ce qui montre clairement l'efficacité de la stratégie interférence même à de faibles concentrations.

Ces résultats montrent une grande efficacité des siRNA transportés par les DLS et suggèrent un très fort potentiel au niveau de l'application de ce système dans des thérapies anticancéreuses. Une extinction de 90% de l'ARNm et de la protéine PAI-1 prouve que le système de vectorisation DLS est un système fiable, efficace même en présence de sérum, non toxique pour les concentrations utilisées et donc applicable *in vivo*.

#### IV. ARTICLE III.

##### **Inhibition of PAI-1 Expression in Breast Cancer Carcinoma Cells by siRNA at nanomolar range.**

Meryet-Figuières M., Resina S., Lavigne C., Barlovatz-Meimon G., Lebleu B. and Thierry A.R.

*Biochimie* 2007,**89**(10):1228-1233.

## Inhibition of PAI-1 expression in breast cancer carcinoma cells by siRNA at nanomolar range

M. Meryet-Figuières<sup>a</sup>, S. Resina<sup>a</sup>, C. Lavigne<sup>b</sup>, G. Barlovatz-Meimon<sup>c</sup>,  
B. Lebleu<sup>a</sup>, A.R. Thierry<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire DIMNP, Département de Défenses Antivirales et Antitumorales, UMR 5235 CNRS, CC 107, Université de Montpellier II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

<sup>b</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, Université de Moncton, Moncton, NB, Canada

<sup>c</sup> Laboratoire IBISC—Informatique, Biologie Intégrative et Systèmes Complexes, FRE 2873 CNRS, Université d'Evry Val d'Essonne/Génopole, 523 place des terrasses de l'Agora, 91000 Evry, France

Received 31 October 2006; accepted 19 March 2007

Available online 2 April 2007

### Abstract

Plasminogen activator inhibitor type I (PAI-1) plays a central role in metastatic behavior by increasing cells' migratory capacities as shown in several tumoral cell lines. Moreover, *in vivo* high expression of this factor helps tumoral growth, both by its role in extracellular matrix remodeling and by favoring angiogenesis. High levels of PAI-1 are correlated with bad prognosis in several cancers, particularly in breast cancer. The effect of PAI-1 upon angiogenesis is also involved in atherosclerosis, in which high levels of PAI-1 expression are observed. Breast carcinoma MDA MB 231 cells are known for both having important metastatic capacities and expressing high levels of PAI-1. We have demonstrated in these cells that the transfection of PAI-1 specific small interfering RNAs (siRNA) specifically inhibited the expression of this factor by 91%. We evaluated siRNA activity by determining PAI-1 mRNA level, as well as intracellular and extracellular PAI-1 protein by using RT Q-PCR, Western blot and ELISA analyses, respectively. Data confirmed inhibition at mRNA levels (primary aim of interference), intracellular protein, and secreted PAI-1, the latter being operative successfully in the cell microenvironment. The lipidic vector Delivery Liposomes System (DLS) used was adapted to siRNA delivery as observed by particle size distribution analysis, confocal microscopy and transfection into MDA MB 231, in the presence of serum. SiRNA activity was clearly detected at concentrations as low as 10 nM. Moreover, the low cytotoxicity of this vector makes it a good candidate for future *in vivo* siRNA delivery.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** siRNA; Plasminogen activator inhibitor type I; Breast cancer; Delivery

### 1. Introduction

Plasminogen activator inhibitor type I (PAI-1) is the main regulator of plasminogen activation and is considered an essential factor in the *in vivo* regulation of the physiological balance between thrombosis and fibrinolysis. PAI-1 interacts with integrins and extracellular matrix components, and regulates cellular adhesion and migration. PAI-1 is therefore

considered to be a key regulator in tumoral invasiveness, metastasis and also in tumoral angiogenesis [1–3]. As an example, breast carcinoma cells MDA MB 231 have an elevated metastatic potential and express very high levels of PAI-1. In keeping with this hypothesis bad prognosis in cancer, breast cancer particularly, is correlated with high PAI-1 expression [1]. These recent observations point out PAI-1 as a new and relevant target in anti-tumoral therapy [4].

In a preliminary study, we demonstrated inhibition of PAI-1 expression with RNA interference in human vascular cells [5]. The present study was aimed at: (i) demonstrating PAI-1 inhibition in breast cancer cells using these previously tailored

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 14 92 05; fax: +33 4 67 14 92 01.  
E-mail address: [alain.thierry@univ-montp2.fr](mailto:alain.thierry@univ-montp2.fr) (A.R. Thierry).



small interfering RNAs (siRNA) sequences; (ii) demonstrating the ability of the lipoplex vector system [6] developed in our laboratory to efficiently deliver siRNA; and (iii) evaluating the feasibility of this approach in terms of duration and level of PAI-1 inhibition.

siRNA are double-stranded RNA molecules usually of 21 to 23 nucleotides long. They have the capacity to recognize and degrade, in a sequence-specific manner, a targeted messenger RNA [7,8]. This mechanism implies the uptake of siRNA by RISC (RNA Induced Silencing Complex) proteic complex inside the cell. This proteic complex has a sequence-specific endonuclease activity, this specificity depending on the sequence of the siRNA used. An increasing number of studies suggest that siRNA are a quick, simple and efficient tool to study a gene function [9]. Moreover, siRNA are really promising as active therapeutic agents to specifically control the expression of particular genes. However, the *in vitro* and *in vivo* use of siRNAs is limited by their weak penetration into cells and tissues, and by their poor biodisponibility [9,10]. We used the DLS (Delivery Liposomes System) lipidic vector previously developed in our laboratory, for its proven efficacy in transfecting plasmid DNA or oligonucleotides, in the presence of serum, and for its lower toxicity than most commercial lipoplex formulations [11–14]. In the present study, siRNA efficiency was evaluated by measuring the inhibition of PAI-1 expression at different cellular levels. PAI-1 mRNA, intracellular and extracellular PAI-1 protein amounts were determined by quantitative RT–PCR, Western blotting and ELISA tests, in MDA MB 231 breast cancer cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture

MDA MB 231 cells were obtained from ATCC and were cultivated in DMEM (Gibco, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) medium supplemented with 10% decomplexed fetal bovine serum (FBS), 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids and 0.04% antibiotics solution (PSN antibiotic mixture) (Gibco), at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were assayed between passages 5 and 10.

### 2.2. siRNAs

Duplex siRNA (siRNA #3) were prepared from the following antisense strand sequence UG AAG CAC AAC UCC CUU AAG GUC and sense strand sequence GA GAC CUU AAG GGA GUU GUG CUU, as previously described by our group [5]. They were purchased from Eurogentec SA (Seraing, Belgium). Universal Negative Control is a non-sense (NS) sequence siRNA purchased from Eurogentec SA.

### 2.3. Lipoplex preparation

SUV (small unilamellar vesicles) were prepared as previously described [11,13]. Briefly, an ethanol solution of a lipid mixture containing 1 mg dioctadecylamidoglycylspermidine

(DOGS, Promega France, Charbonnières) and 1 mg of dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE, Sigma-Aldrich Chimie SARL, St Quentin Fallavier, France) was injected in aqueous solution. Resulting SUV have a final concentration of 5 mg/ml lipids. This preparation can be kept for over 9 months at 4 °C (data not shown). Then, SUV were complexed with PAI-1 specific control siRNA to form DLS siRNA lipoplexes. DLS/siRNA complexes were formed by mixing 50 µl of a solution containing 12 µg of siRNA (in de-ionized water sterilized on 0.2 µm filter), and 75 µl of a solution resulting from a mixture of 25 µl of SUV and 50 µl of NaCl 150 mM. After 15 min incubation at room temperature the mixture was slightly mixed and kept at 4 °C until use. Complexes of siRNA with Lipofectamine<sup>®</sup> reagent (Invitrogen) were prepared according to the manufacturer's instructions.

### 2.4. Particle size distribution analysis

Particle size was measured by Dynamic Light Scattering using a Malvern 4800 Autosizer apparatus (Malvern Instruments, Orsay, France). Measurements were carried out using the contin mode. The intensity-based distributions were obtained in the Gaussian-fit mode using the 7132 digital correlator PCS software. Particle average diameters were determined as a Z-average using a monomodal method (a cumulant analysis). Width (width at half peak height) is indicative of the homogeneity of size distribution.

### 2.5. siRNA transfection

Cells were split into 6-well culture plates at  $3.5 \times 10^5$  cells per well. At transfection time, the culture medium was replaced with 1 ml transfection medium (optiMEM for transfections without serum, DMEM with decomplexed serum for transfections with serum) containing lipoplexes. For transfections with optiMEM, cells were incubated for 8 h into transfection medium. The medium was then replaced with 1.5 ml of serum-complemented cell culture medium. Twenty-four hours before the end of the experiment, cells were washed with 2 ml PBS (Gibco) and 1.5 ml culture medium was added. The cell culture medium was harvested and the cells were dissociated from the wells with 300 µl per well of Cell Dissociation Solution (Sigma), and washed in 200 µl PBS. Samples were kept at –80 °C until analysis.

### 2.6. Quantitative RT–PCR: analysis of PAI-1 mRNA

Cells were transfected for 8 h with 200 nM PAI-1 siRNA and post incubated for various time points. 24 h before being harvested, cells were rinsed with PBS and fresh culture medium was added, except for 8 or 24 h time point. Cells stored at –80 °C were resuspended in 200 µl PBS, and mRNA was extracted with the High Pure RNA Isolation kit (Roche Diagnostics France S.A., Meylan) according to the supplier's protocol. mRNA purity was checked on 1% agarose gel. mRNA retrotranscription into cDNA was made by retrotranscriptase Superscript III (Invitrogen) with random decamer primers

(Ambion Europe Ltd., Huntingdon, UK). Retrotranscription products were re-purified with the PCR product purification kit (QIAquick, QIAGEN S.A. France, Courtaboeuf).

cDNA transcripts were analyzed by Q-PCR (Quantitative PCR) for PAI-1 mRNA using TGC TGG TGA ATG CCC TCT ACT as sense primer and CGG TCA TTC CCA GGT TCT CTA as antisense primer. For GAPDH, mRNA analysis ACA GTC CAT GCC ATC ACT GCC was used as sense primer and GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG as antisense primer. All primer oligonucleotides were obtained from Eurogentec (Seraing, Belgium). Primer sequences for PAI-1 [5] and GAPDH [15] have been previously described. Q-PCR was performed with a Lightcycler (Roche) using a Q-PCR mix composition as previously described [16]. PAI-1 mRNA amounts were standardized to GAPDH mRNA quantities. Specific inhibition of mRNA PAI-1 level in PAI-1 siRNA-treated cells was expressed as percentage of the PAI-1 mRNA level determined in non-sense siRNA-treated cells.

### 2.7. Immunochemical detection of PAI-1 protein

Extracellular PAI-1 concentration was determined in the cell culture medium by an ELISA test, according to the supplier's protocol (Kit ELISA PAI-1, DakoCytomation S.A.S., Trappes, France) and intracellular PAI-1 was estimated by Western blot. In both cases, frozen cells were resuspended in 200 µl extraction buffer (M-PER, Pierce, Perbio Science France SAS, Brebieres). After 5 min incubation at room temperature, cell lysates were centrifuged for 5 min at 8000 rpm and the supernatants were tested for protein concentration by the BCA test (Pierce). Proteins were fractionated on an SDS-PAGE gel electrophoresis (10% polyacrylamide, 180 V, 1 h). Proteins were transferred electrophoretically on a nitrocellulose membrane at 35 V and 4 °C overnight. Membranes were blocked in a TBS solution with 0.05% Tween-20 and 5% milk and incubated with a rabbit polyclonal anti-PAI-1 antibody (1:3000 dilution, Polyclonal, Santa Cruz, CA, USA). The membranes were then incubated with the secondary horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit antibody (1:10,000 dilution, Sigma) and revealed with the West Dura Supersignal kit (Pierce). The signal was analyzed the Lumi Imager (Roche).

### 3. Results and discussion

Our group has previously designed and tested various siRNA sequences to inhibit PAI-1 expression in HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) and HASMC (human arterial smooth muscle cells) cell lines as a novel approach to control cardiovascular diseases [5]. With the objective of controlling breast cancer, we have used in the present study the most potent siRNA sequence tested (siRNA #3). This siRNA activity showed a specific decrease of up to 90% of PAI-1 expression in both types of cells [5].

In our initial study, siRNAs were vectorized with the commercially available Lipofectamine Reagent (LFA) lipoplex formulation. Here, we have adapted to the delivery of siRNA the DLS lipoplex formulation, which we previously developed

for gene transfer [17,18] or antisense oligonucleotides therapeutics [14,18,19]. The DLS/siRNA formulation was optimized by measuring extracellular PAI-1 following treatment and by particle size distribution. A 10.4 lipid-to-siRNA weight ratio was found to be optimal (data not shown). The “Dynamic Light Scattering” analysis of DLS/siRNA particles showed an average size of 248 nm and a half-height width of 145 nm (Fig. 1). The auto-assembling process between the lipids and siRNA gave rise to an increase of the mean size of DLS/siRNA particles, compared to that of empty liposomes (137 nm, 149 width, data not shown), as previously described for other types of nucleic acids [12,13,20,21]. We previously demonstrated that stable lipoplex preparation of low mean size could reproducibly be obtained with using circular, double-stranded or single-stranded linear DNA and oligonucleotides ([21] and data not shown). We show here that stable lipoplex made from double-stranded RNA could be obtained by this method, the optimal lipid/siRNA ratio (10.4 lipid-to-siRNA weight ratio) being in the vicinity of that employed for antisense oligonucleotides (12.5 lipid-to-oligonucleotides weight ratio) [13,14]. DLS/siRNA lipoplexes are slightly larger (248 nm, Fig. 1) than DLS/oligonucleotides ones (150–180 nm) [13,14]. However, the low mean size and the polydispersity index obtained for DLS/siRNA lipoplexes is compatible with *in vivo* administration. siRNA labeled with DLS lipoplexes showed high and rapid uptake in MDA MB 231 cells, as intracellular fluorescence was clearly observable as early as 4 h incubation time, in serum-containing medium, at a DLS/siRNA concentration of 50 nM (data not shown).

Fluorescence was distributed throughout the cells following 24 h incubation with higher concentration in the perinuclear regions and some cytoplasm regions (data not shown). It should be noted that this intracellular distribution pattern is somewhat different to that of oligonucleotide present in DLS lipoplex, which showed clear accumulation in the nucleus compartment [14,26]. This is under investigation. Nonetheless, this study demonstrates that siRNA was distributed in

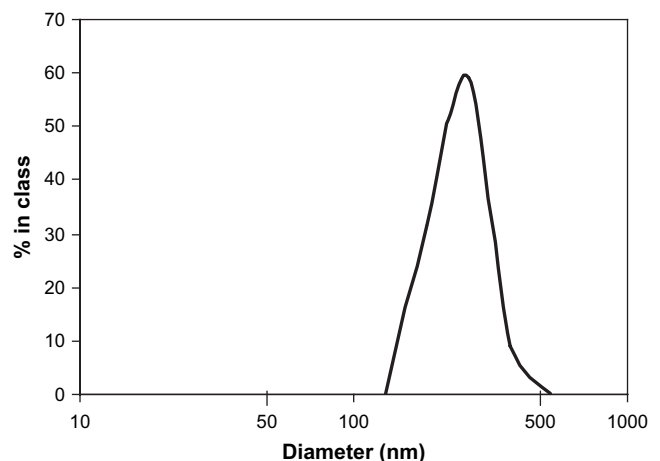


Fig. 1. Characterization of DLS lipoplexes. Mean diameter of DLS/siRNA particles as measured by dynamic light scattering. Average diameters were evaluated as a Z-average using intensity-based distributions (% in class).

cytoplasm, consequently being available for RNA interference (data not shown).

PAI-1 mRNA levels were quantified by RT Q-PCR. Inhibition could be detected as early as 8 h of transfection, reached a maximum of 89% inhibition at 24 h and lasted at least up to 96 h after a single addition of DLS/PAI-1 siRNA lipoplexes (Fig. 2A). Following 48, 72 and 96 h after addition of DLS/siRNA, the specific activity of siRNA appeared to decrease by 1.1%, 2.2% and 4.5%, respectively. This suggests that in these cell culture conditions, siRNA activity might last for up to more than a week. It has to be noted that this siRNA effect appears longer than that of antisense oligonucleotides, as investigated using the same delivery system but with another cell culture experimental model [13,14]. In the presence of serum, siRNA at a concentration of 300 nM and vectorized by DLS still gave rise to 39% inhibition 24 h after transfection while no effect was observed when using the LFA (data not shown). Use of DLS/non-sense siRNA do not lead to any detectable inhibition of PAI-1 mRNA as compared to non-treated

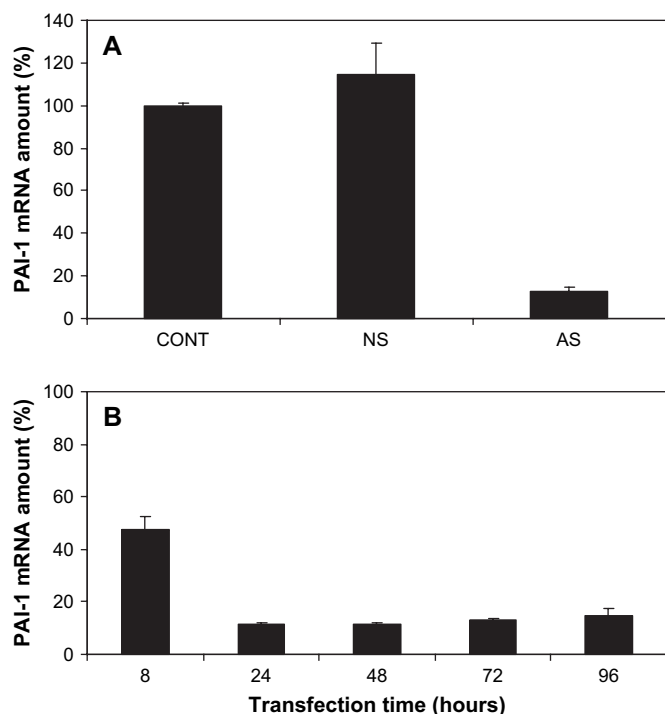


Fig. 2. (A) Specific activity of PAI-1 siRNA in MDA MB 231 breast cancer cells. PAI-1 mRNA level was determined by RT Q-PCR in cells incubated for 24 h with 200 nM (AS) anti-PAI-1 siRNA or (NS) non-sense siRNA. siRNA were delivered with the DLS lipoplexes, in optiMEM. (CONT), non-treated cells. PAI-1 mRNA level were standardized to GAPDH mRNA level and expressed in percentage of the level found in non-treated cells. Levels are average values  $\pm$  standard deviation of triplicate determination, except for CONT (duplicate). (B) Time course of PAI-1 mRNA inhibition after a single addition of DLS/siRNA lipoplexes. siRNA were vectorized by DLS in optiMEM at a siRNA concentration of 200 nM. Cells were harvested at indicated times post transfection. PAI-1 mRNA levels were analyzed by RT Q-PCR. PAI-1 mRNA amounts were standardized to GAPDH mRNA amounts and expressed in percentages compared with respective controls (non-sense siRNA). Values are average values  $\pm$  standard deviation for triplicates.

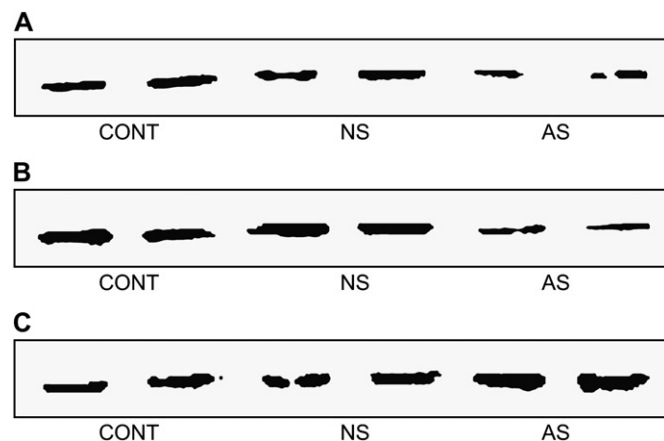


Fig. 3. Intracellular PAI-1 protein levels after incubation with DLS/siRNA lipoplexes in the presence of serum. siRNA were vectorized by DLS (A and B) or Lipofectamine<sup>®</sup> Reagent (C) in the presence of serum at siRNA concentrations of 100 nM (B and C) or 10 nM (A). MDA MB 231 cells were harvested 48 h post transfection. PAI-1 levels in cellular extracts was analyzed by Western blot. AS, antisense DLS/siRNA; NS, non-sense DLS/siRNA; CONT, non-treated cells. Two electrophoretic lanes of Western blot analysis at the region of PAI-1 protein migration, are presented for AS, NS and CONT.

cells (Fig. 2B), demonstrating sequence-specific activity and absence of cytotoxicity at 200 nM concentration.

The down-regulation of PAI-1 by siRNA was confirmed by Western blot analysis of the inhibition of intracellular PAI-1 in MDA MB 231 cells. Fig. 3B shows an important inhibition of intracellular PAI-1 following treatment in serum-containing culture medium with a siRNA dose of 100 nM. A noticeable inhibition remains with a siRNA concentration as low as 10 nM (Fig. 3A). At variance, the delivery of PAI-1 siRNA with LFA is inefficient (Fig. 3C), in keeping with RT Q-PCR data. Control non-sense siRNA had no effect on PAI-1 protein levels, whether delivered with DLS lipoplexes or with LFA.

The quantification of secreted PAI-1 levels is critical as the PAI-1 physiological effect is extracellular. Indeed PAI-1 is found either in a soluble form or a matrix-bound one. There is increasing evidence of a PAI-1 role pivotal in cancer cell migration, including in its matrix-bound form. Thus, targeting the totality (both forms) of the secreted PAI-1 seems essential for our purpose. siRNA effect was detected at concentrations as low as 1 nM (Fig. 4) with an  $IC_{50}$  around 10 nM DLS/siRNA. A maximal inhibition (91%) of secreted PAI-1 in the culture medium was achieved, 48 h post transfection, with a siRNA concentration of 300 nM, in optiMEM culture medium. Nevertheless, at this concentration, cytotoxicity becomes detectable according to the protein levels (inhibition level  $>$  20% of total protein, data not shown). At 200 nM and lower concentrations DLS/siRNA did not lead to any cytotoxicity as no significant difference was found either in terms of total proteins in treated and non-treated cells, or in terms of secreted PAI-1 between control non-sense siRNA and non-treated cells. At 200 nM siRNA secreted PAI-1 inhibition reached 86%. It has to be noted that this level of inhibitory activity ( $\approx$  90%) of this siRNA sequence is similar to

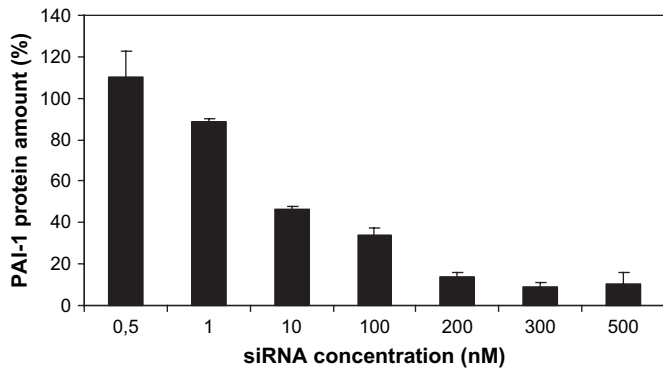


Fig. 4. Dose effect on PAI-1 protein secretion after incubating MDA MB 231 cells with DLS/siRNA. siRNA were vectorized by DLS and incubated in optiMEM at indicated concentrations. Cells were harvested 48 h post transfection. PAI-1 protein levels in the culture medium was analyzed by ELISA and expressed in percentage compared to respective controls (non-sense siRNA). Presented values are average values  $\pm$  standard deviation for duplicates.

that obtained in endothelial cells with using LFA in a culture medium without serum [5]. In the literature, siRNA treatment was shown to lead to transient complete or incomplete blockade of the target protein expression, depending on the cell culture model used [22–25]. In the presence of serum and 48 h post transfection, a 34% inhibition was achieved for a siRNA concentration of 300 nM (data not shown). No cytotoxicity was observed even at a siRNA concentration up to 500 nM, in serum-containing medium. Use of serum-containing medium is poorly documented and to our knowledge no complete blockade via RNA interference has been reported thus far in mammalian cells.

Data obtained here are concordant and show clearly inhibition of PAI-1 expression by RNA interference in tumoral cells. A maximal inhibition was achieved 24 h post transfection for PAI-1 mRNA (Fig. 2A), and 48 h post transfection for intracellular and secreted PAI-1 protein, as expected (data not shown).

In the absence of serum, DLS lipoplexes are as efficient as commercial lipidic formulations for antisense oligonucleotides [12] and for siRNA intracellular delivery, as shown here. It should be noted that LFA provided somewhat similar delivery efficiency of PAI-1 siRNA delivery compared to the DLS system when treatment was carried out in optiMEM instead of serum-containing medium. The inhibitory effect was found to be 11% and 54% using the DLS vector and, 36% and 41% with LFA, at 1 and 10 nM concentration, respectively (data not shown). This delivery system was also applied for vectorizing steric block oligonucleotides to correct aberrant splicing in an experimental cell culture model using the mutated  $\beta$ -thalassaemia intron [26]. Activity was detected at concentrations as low as 1 nM and 10 nM in optiMEM and serum-containing medium, respectively, while no activity was observed using the LFA when treatment was carried out in serum-containing medium [26].

The DLS formulation is advantageous on several points. First, DLS lipoplexes are less cytotoxic than commercially available lipid transfection reagents [11,12,14,20] such as LFA. Second, DLS-mediated transfection is possible in the presence of serum, while serum-free conditions are usually

required for siRNA delivery, with commercial lipoplex formulation. When cells were treated in fetal bovine serum-containing medium, siRNA activity was observed but at a lower level (34% vs. 86% maximal inhibition at the non-cytotoxic concentration). This sensitivity toward biodegradation was not observed for the DLS-mediated delivery of plasmid DNA or of antisense oligonucleotides, for which serum had no limiting effect [13,20]. This could be due to incomplete complex formation between the lipids and siRNA leading to instability of DLS/siRNA particles and consequently to siRNA exposure to serum nucleases. Reasons for this specific sensitivity are under investigation, particularly the study on the lipoplex particle ultrastructure when using siRNA in order to optimize this delivery system for siRNA. Third, DLS/siRNA particles are stable, homogeneous and reproducible, in terms of size.

In order to apply this strategy for controlling breast cancer and cell invasion capacity, it would be relevant to conduct the same study with other breast cancer cell lines. Use of MCF-7 cells, which express PAI-1 at a lower level than that found in MDA MB 231 cells and have a reduced migratory capacity, could make possible to observe whether PAI-1 siRNA might knock out rather than knock down gene expression of PAI-1. Although we clearly demonstrated that siRNA could be a potentially powerful therapeutic tool for PAI-1 inhibition, this study lacks physiological data. Cellular motility assays, especially in 3D-Matrigel cell culture, are under way. Finally, a positive outcome for *in vivo* administration into SCID mice transplanted with MCF-7 or MBA MB 231 cells will be envisaged, since *in vivo* DLS delivery of nucleic acids has already been documented [11,12,19,20].

## References

- [1] B. Chazaud, R. Ricoux, C. Christov, A. Plonquet, R.K. Gherardi, G. Barlovatz-Meimon, Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations, *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 237–246.
- [2] K. Bajou, J.M. Lewalle, C.R. Martinez, C. Soria, H. Lu, A. Noel, J.M. Foidart, Human breast adenocarcinoma cell lines promote angiogenesis by providing cells with uPA-PAI-1 and by enhancing their expression, *Int. J. Cancer* 100 (2002) 501–506.
- [3] A.P. Mazar, J. Henkin, R.H. Goldfarb, The urokinase plasminogen activator system in cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis, *Angiogenesis* 3 (1999) 15–32.
- [4] T.D. Brooks, S.W. Wang, N. Brunner, P.A. Charlton, XR5967, a novel modulator of plasminogen activator inhibitor-1 activity, suppresses tumor cell invasion and angiogenesis *in vitro*, *Anticancer Drugs* 15 (2004) 37–44.
- [5] A. Hecke, H. Brooks, M. Meryet-Figuiere, S. Minne, S. Konstantinides, G. Hasenfuss, B. Lebleu, K. Schafer, Successful silencing of plasminogen activator inhibitor-1 in human vascular endothelial cells using small interfering RNA, *Thromb. Haemost.* 95 (2006) 857–864.
- [6] P.L. Felgner, Y. Barenholz, J.P. Behr, S.H. Cheng, P. Cullis, L. Huang, J.A. Jessee, L. Seymour, F. Szoka, A.R. Thierry, E. Wagner, G. Wu, Nomenclature for synthetic gene delivery systems, *Hum. Gene Ther.* 8 (1997) 511–512.
- [7] A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 391 (1998) 806–811.
- [8] L. Gitlin, S. Karelsky, R. Andino, Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells, *Nature* 418 (2002) 430–434.

- [9] R.K. Leung, P.A. Whittaker, RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics, *Pharmacol. Ther.* 107 (2005) 222–239.
- [10] P. Lingor, U. Michel, U. Scholl, M. Bahr, S. Kugler, Transfection of “naked” siRNA results in endosomal uptake and metabolic impairment in cultured neurons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 1126–1133.
- [11] A.R. Thierry, Y. Lunardi-Iskandar, J.L. Bryant, P. Rabinovich, R.C. Gallo, L.C. Mahan, Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995) 9742–9746.
- [12] A.R. Thierry, P. Rabinovich, B. Peng, L.C. Mahan, J.L. Bryant, R.C. Gallo, Characterization of liposome-mediated gene delivery: expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA, *Gene Ther.* 4 (1997) 226–237.
- [13] C. Lavigne, A.R. Thierry, Enhanced antisense inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in cell cultures by DLS delivery system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237 (1997) 566–571.
- [14] A.R. Thierry, S. Abes, S. Resina, A. Travo, J.P. Richard, P. Prevot, B. Lebleu, Comparison of basic peptides- and lipid-based strategies for the delivery of splice correcting oligonucleotides, *Biochim. Biophys. Acta.* 1758 (2006) 364–374.
- [15] E. Dondi, L. Rogge, G. Lutfalla, G. Uze, S. Pellegrini, Down-modulation of responses to type I IFN upon T cell activation, *J. Immunol.* 170 (2003) 749–756.
- [16] G. Lutfalla, G. Uze, Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments, *Methods Enzymol.* 410 (2006) 386–400.
- [17] I. Aksentijevich, I. Pastan, Y. Lunardi-Iskandar, R.C. Gallo, M.M. Gottesman, A.R. Thierry, In vitro and in vivo liposome-mediated gene transfer leads to human MDR1 expression in mouse bone marrow progenitor cells, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) 1111–1122.
- [18] M. Baudard, T.R. Flotte, J.M. Aran, A.R. Thierry, I. Pastan, M.G. Pang, W.G. Kearns, M.M. Gottesman, Expression of the human multidrug resistance and glucocerebrosidase cDNAs from adeno-associated vectors: efficient promoter activity of AAV sequences and in vivo delivery via liposomes, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) 1309–1322.
- [19] B. Tavtavian, S. Marzabal, V. Boutet, B. Kuhnast, S. Terrazzino, M. Moynier, F. Dolle, J.R. Deverre, A.R. Thierry, Characterization of a synthetic anionic vector for oligonucleotide delivery using in vivo whole body dynamic imaging, *Pharm. Res.* 19 (2002) 367–376.
- [20] C. Lavigne, Y. Lunardi-Iskandar, B. Lebleu, A.R. Thierry, Cationic liposomes/lipids for oligonucleotide delivery: application to the inhibition of tumorigenicity of Kaposi’s sarcoma by vascular endothelial growth factor antisense oligodeoxynucleotides, *Methods Enzymol.* 387 (2004) 189–210.
- [21] M. Schmutz, D. Durand, A. Debin, Y. Palvadeau, A. Etienne, A.R. Thierry, DNA packing in stable lipid complexes designed for gene transfer imitates DNA compaction in bacteriophage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 12293–12298.
- [22] M. Hamada, T. Ohtsuka, R. Kawaida, M. Koizumi, K. Morita, H. Furukawa, T. Imanishi, M. Miyagishi, K. Taira, Effects on RNA interference in gene expression (RNAi) in cultured mammalian cells of mismatches and the introduction of chemical modifications at the 3’-ends of siRNAs, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 12 (2002) 301–309.
- [23] M. Kappler, M. Bache, F. Bartel, M. Kotzsch, M. Panian, P. Wurl, K. Blumke, H. Schmidt, A. Meye, H. Taubert, Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduces the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of p53, *Cancer Gene Ther.* 11 (2004) 186–193.
- [24] S. Ning, S. Fuessel, M. Kotzsch, K. Kraemer, M. Kappler, U. Schmidt, H. Taubert, M.P. Wirth, A. Meye, siRNA-mediated down-regulation of survivin inhibits bladder cancer cell growth, *Int. J. Oncol.* 25 (2004) 1065–1071.
- [25] A.D. Judge, G. Bola, A.C. Lee, I. MacLachlan, Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo, *Mol. Ther.* 13 (2006) 494–505.
- [26] S. Resina, R. Kole, A. Travo, B. Lebleu, A.R. Thierry, Switching on transgene expression by correcting aberrant splicing with using multi-targeting steric block oligonucleotides, *J. Gen. Med.*, in press.



**ARTICLE IV**

**« Stratégies basées sur les lipoplexes et les peptides pour la  
délivrance d'oligonucléotides à blocage stérique »**

International Journal of Pharmaceutics

Volume **344**(1-2):96-102, 2007

## ***I. INTRODUCTION.***

A la suite du 1<sup>er</sup> article, cette étude propose de comparer les stratégies basées sur les lipides cationiques et sur de nouveaux peptides originaux :

◆ peptides : PNA, PNA-4K, TAT-PNA, K<sub>8</sub>-PNA et (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PNA

◆ lipides cationiques : DLS associés à des 2'O-Me et des MOE.

Dans ce but, les divers systèmes de délivrance ont été évalués *in vitro* lors de la correction de l'épissage alternatif déficient, et leur internalisation intracellulaire a été observée par microscopie à fluorescence.

D'une part, le peptide (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PNA, à la différence des autres peptides testés, préconise pour la 1<sup>ère</sup> fois des résultats prometteurs sans l'ajout d'agent endosomolytique. D'autre part, l'association de lipides cationiques complexés à des PNA n'avait jamais été réalisée. La comparaison des systèmes promettait d'être intéressante, les 2 ayant leurs points faibles :

- peptides : séquestration dans les endosomes, efficacité et toxicité à fortes concentrations ( $> 1\mu\text{M}$ ), inactivation en présence de protéines sériques
- lipides cationiques : toxicité à faibles concentrations ( $\leq 1\mu\text{M}$ ), inactivation en présence de protéines sériques.

## ***II. CONTRIBUTION.***

Dans cet article, j'ai réalisé toutes les expériences de correction de l'épissage, impliquant les vecteurs DLS, le Tat et le PNA (Figures 2 et 3). Les essais concernant le peptide (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PNA ont été effectués avec l'aide de Saïd ABES. Les expériences de microscopie ont été réalisées par Paul PREVOT.

## ***III. CONCLUSION.***

La formulation de liposomes avec des ON de charge globalement neutre n'est pas possible et ne donne pas lieu à la formation de particules. En effet, contrairement aux ON chargés négativement comme les 2'O-Me et les MOE, les formulations à base de DLS et de PNA ou de PNA-4K n'ont pas donné lieu à la formation de complexes stables.

Comme la majeure partie des CPP, les TAT-PNA pénètrent rapidement dans les cellules, certainement par endocytose médiée par la voie des clathrines, via les protéoglycans membranaires (Richard *et al.* 2003, Abes *et al.* 2007). Ils sont ensuite séquestrés dans les

endosomes jusqu'à leur dégradation et ne peuvent donc pas pénétrer dans le noyau des cellules, à l'inverse des ON véhiculés par les DLS.

D'après ces observations, il semble logique que les CPP ne corrigent pas l'épissage, ou très peu, sans agent endosomolytique. C'est le cas des PNA, des TAT-PNA et des K<sub>8</sub>-PNA. Le peptide original (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PNA sort cependant du lot et corrige efficacement l'épissage, sans ajout de chloroquine, pour des concentrations de l'ordre du µM. Ce peptide ne montre pas de toxicité à de telles doses.

1µM de (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PNA est aussi efficace que 50nM de DLS / MOE. Les liposomes restent donc plus efficaces et à de plus faibles concentrations : 100 à 200nM d'ON. Des résultats parallèles ont montré que le (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PNA restait toujours en majorité séquestré dans les endosomes et que seule une petite partie de peptides parviendrait à pénétrer jusqu'au noyau. La correction d'épissage obtenue correspond donc à une infime partie du peptide. Leur délivrance dans le noyau des cellules peut donc être améliorée. L'avenir de nouveaux CPP est donc très prometteur mais de nombreux progrès sur la chimie des peptides restent encore à être réalisés.

#### **IV. ARTICLE IV.**

##### **Lipoplex and peptide-based strategies for the delivery of steric-block oligonucleotides.**

Resina S., Abes S., Turner J.J., Prevot P., Travo A., Clair P., Gait M.J., Thierry A.R. and Lebleu B.

*International Journal of Pharmaceutics*, 2007, **344**(1-2):96-102.



## Lipoplex and peptide-based strategies for the delivery of steric-block oligonucleotides

Sarah Resina<sup>a</sup>, Saïd Abes<sup>a</sup>, John J. Turner<sup>b</sup>, Paul Prevot<sup>a</sup>, Adrian Travo<sup>a</sup>,  
Philippe Clair<sup>a</sup>, Michael J. Gait<sup>b</sup>, Alain R. Thierry<sup>a</sup>, Bernard Lebleu<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Département de Défenses Antivirales et Antitumorales, UMR 5235-CC086, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France*

<sup>b</sup> *Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK*

Received 5 February 2007; received in revised form 20 April 2007; accepted 29 April 2007

Available online 17 May 2007

### Abstract

Synthetic oligonucleotides offer interesting prospects for the control of gene expression but clinical applications have been severely limited by their poor bioavailability.

Cationic lipids have been widely used for the delivery of charged oligonucleotide (ON) analogues but most of the commercial formulations are toxic and poorly stable in the presence of serum proteins. We have developed a DOGS/DOPE liposome formulation named DLS (for delivery liposomal system), that allows for the efficient nuclear delivery of negatively charged antisense ON analogues as monitored by fluorescence microscopy and by their ability to correct deficient pre-mRNA splicing, even in serum-supplemented cell culture.

Uncharged DNA mimics such as peptide nucleic acids (PNA), or phosphorodiamidate morpholino (PMO) ON are particularly interesting for their high metabolic stability and affinity for complementary RNA targets but they cannot be delivered with cationic lipids. Cell penetrating peptides (CPP), such as Tat or penetratin, have been used widely as conjugates for the delivery of various biomolecules and might be appropriate for neutral ON analogues. However, entrapment within endocytic vesicles severely limits the efficiency of PNA delivery by CPPs in the absence of endosomolytic drugs, such as chloroquine. The conjugation of new arginine-rich CPPs to PNA allows efficient nuclear delivery in the absence of chloroquine as monitored in a splicing correction assay.

Both strategies have their advantages but DLS-mediated delivery remains more efficient than CPP delivery for the nuclear targeting of splice correcting ON analogues *in vitro*.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Antisense oligonucleotide; Splice correction; Lipoplex; Cell penetrating peptide

### 1. Introduction

The majority of human genes undergo alternative splicing by a complex and tightly regulated machinery involving the sequence-specific binding of a vast collection of proteins to nuclear pre-mRNA. Steric interference by transfected RNase-H incompetent oligonucleotides (ON) analogues named steric-block ON or splice switching ON has been proven efficient to re-orient the splicing machinery towards the preferential synthesis of a given mRNA species (Mercatante et al., 2001; Sazani

et al., 2002b; Sazani and Kole, 2003). Clinical applications may be envisaged as for instance in the treatment of cancers through alterations of the balance between anti- and pro-apoptotic forms of bcl-X, or in the treatment of Duchenne muscular dystrophy through skipping of the mutated exons in dystrophin pre-mRNA (Lu et al., 2005; Kole et al., 2004a,b).

Splice switching requires the sequence-specific binding of nuclease-resistant and high affinity RNase-H incompetent ON analogues to pre-mRNA. Both charged (such as 2'-O-methyl or 2'-O-methoxyethyl-phosphorothioate ON) or neutral (such as peptide nucleic acids or phosphorodiamidate morpholino oligomers) are well suited as splice switching ON (Abes et al., 2006a,b, 2007; DeLong et al., 1999; Kang et al., 1998; Sazani et al., 2001, 2002a; Thierry et al., 2006; Youngblood et al., 2007).

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 14 92 03; fax: +33 4 67 14 92 01.  
E-mail address: [bernard.lebleu@univ-montp2.fr](mailto:bernard.lebleu@univ-montp2.fr) (B. Lebleu).

As for other ON-based strategies for gene regulation, efficient delivery within the appropriate cellular compartment remains a major roadblock (Thierry et al., 2003).

Negatively charged ON analogues are most generally transfected as complexes with cationic lipids. However, cytotoxicity and instability in the presence of serum proteins seriously limit their *in vivo* use. New formulations with a lower positive net charge and high particle size homogeneity as the DLS (delivery liposomal system) liposomes developed by our group have proven efficient for the delivery of nucleic acids in serum-containing medium and even *in vivo* in animal models (Lavigne et al., 2001, 2004; Thierry et al., 1997; Schmutz et al., 1999; Tavittian et al., 2002).

Lipoplexes formulations are not suitable for uncharged ON delivery. Cell penetrating peptides (CPP) have been investigated by several groups. Unfortunately, entrapment within endocytotic vesicles has been a major limitation with most CPPs (Abes et al., 2006a, 2007; Bendifallah et al., 2006; El-Andalousi et al., 2006; Koppelhus et al., 2002; Kaihatsu et al., 2004; Richard et al., 2003; Shiraishi et al., 2005; Turner et al., 2005a).

The present study aimed at comparing the splicing correction efficiency and the intracellular distribution of CPP-conjugated PNAs and lipoplexes-associated 2'-O-Me and MOE ON within the same system which has not been done previously. We have made use of the splicing correction assay proposed by Kang et al. (1998), in which the mutated intron 2 of the human  $\beta$ -globin gene has been inserted within the coding sequence of a luciferase reporter gene. The activation of a cryptic splice site in this intron prevents its complete removal unless the mutated site is masked by a steric-block ON analogue.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell line

The HeLa pLuc/705 cell line was stably transfected with the pLuc/705 plasmid, in which the coding region of the luciferase sequence is interrupted by the mutated  $\beta$ -globin intron (Kang et al., 1998). HeLa pLuc/705 cells were grown at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in minimal essential DMEM medium (Gibco, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% sodium pyruvate, non-essential amino acids and a mix of penicillin, streptomycin and neomycin (100 $\times$ , Gibco).

Cells were checked routinely for the absence of mycoplasma contamination.

### 2.2. Antisense oligonucleotides

Antisense ON sequences are listed in Table 1. The 2'-O-methyl-oligoribonucleotides (2'-O-Me) were purchased from Eurogentec SA (Seraing, Belgium). 2'-O-Methoxyethyl-oligoribonucleoside-phosphorothioates (MOE) were a gift from Dr. Ryszard Kole (Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina, Chapel Hill, USA). ON<sub>705</sub> is the antisense sequence hybridizing to the  $\beta$ -globin intron mutation. SCR<sub>705</sub> is the scrambled version of ON<sub>705</sub>. NS<sub>654</sub> is a nonsense sequence hybridizing on 654 position in the  $\beta$ -globin intron.

### 2.3. PNA and PNA-CPP conjugates

Peptide conjugates sequences are listed in Table 1.

#### 2.3.1. Synthesis of peptides

(R-Ahx-R)<sub>4</sub>C with free N-terminus and C-terminal amide was synthesized on a PerSeptive Biosystems Pioneer peptide synthesizer (100  $\mu$ mol scale) using standard Fmoc/*tert*-butyl solid phase synthesis techniques as C-terminal amide peptides using NovaSyn TGR resin (Novabiochem). Deprotection of all peptides and cleavage from the solid support was achieved by treatment with trifluoroacetic acid (TFA) in the presence of triethylsilane (1%), ethane dithiol (2.5%) and water (2.5%). Purification was carried out by reversed phase HPLC as previously described (Turner et al., 2005b) and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry with the same matrix as for PNA.

#### 2.3.2. Synthesis of PNA and PNA-peptides

N-terminal bromoacetyl-containing PNA<sub>705</sub> was obtained from Panagene ([www.panagen.com](http://www.panagen.com)). PNA<sub>705</sub>-4K and PNA<sub>705</sub> were synthesized as previously described (Abes et al., 2006a).

Stably linked K<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub> and Tat-PNA<sub>705</sub> conjugates were synthesized by continuous PNA/peptide synthesis as previously described (Turner et al., 2005a). FAM-labelled Tat-PNA<sub>705</sub> was synthesized by 6-carboxyfluorescein diacetate conjugation to the N-terminus during solid phase Tat-PNA synthesis as previously described (Turner et al., 2005a). To prepare (R-Ahx-

Table 1  
Antisense oligomers

Oligomers	Sequences
2'-O-Me ON <sub>705</sub>	CCU CUU ACC UCA GUU ACA
2'-O-Me SCR <sub>705</sub>	ACU ACC CGA UAU CUC CUC
MOE ON <sub>705</sub>	CCT CTT ACC TCA GTT ACA
MOE NS <sub>654</sub>	GCT ATT ACC TTA ACC CAG
PNA <sub>705</sub>	H-CCT CTT ACC TCA GTT ACA-NH <sub>2</sub>
PNA <sub>705</sub> -4K	H-CCT CTT ACC TCA GTT ACA-K <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>
Tat-PNA <sub>705</sub>	NH <sub>2</sub> -GRKKRRQRRRP-(O-linker)-CCT CTT ACC TCA GTT ACA-NH <sub>2</sub>
K <sub>8</sub> -PNA <sub>705</sub>	NH <sub>2</sub> -K <sub>8</sub> -CCT CTT ACC TCA GTT ACA-K-NH <sub>2</sub>
(R-Ahx-R) <sub>4</sub> -PNA <sub>705</sub>	NH <sub>2</sub> -R-Ahx-RR-Ahx-RR-Ahx-RR-Ahx-R-Ahx-R-C-thioacetyl-K-CCT CTT ACC TCA GTT ACA-KKK-NH <sub>2</sub>

Ahx = 6-aminohexanoic acid.

R)<sub>4</sub>-PNA<sub>705</sub>, 50 nmol bromoacetyl PNA was dissolved in 45  $\mu$ l formamide and 10  $\mu$ l BisTris. HBr buffer (pH 7.5) and 15.6  $\mu$ l C-terminal-Cys-containing peptide (8 mM, 125 nmol, 2.5 equiv.) was added. The solution was heated at 40 °C for 2 h and the product was purified by reversed phase HPLC at 45 °C using water bath heating and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. MALDI-TOF mass spectrometry was carried out on a Voyager DE Pro BioSpectrometry workstation with a matrix of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 10 mg/ml in acetonitrile/3% aqueous trifluoroacetic acid (1:1, v/v). The accuracy of the mass measurement in linear mode is regarded by the manufacturer as  $\pm 0.05\%$ , but since internal calibration was not used, the determined values varied in a few cases from the calculated by  $\pm 0.1\%$ .

#### 2.4. Lipoplex formulation

DLS (delivery liposomal system) lipoplexes consist of small unilamellar vesicles, which can complex negatively charged

ON. DLS were formed by mixing 1 mg of dioctadecylamidoglycylspermidine (DOGS, Promega France, Charbonnieres) and 1 mg of dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE, Sigma–Aldrich Chimie SARL, St. Quentin Fallavier, France) as described previously (Lavigne and Thierry, 1997). ON were rapidly mixed with the liposomes in sterile dionized water at a final concentration of 45 mM NaCl. The final lipoplex preparation contained 10  $\mu$ g of ON for 38  $\mu$ l of DLS liposomes. Lipoplexes were stored at 4 °C until use. Complexes of ON with the Lipofectamine™ Reagent (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) were prepared according to the manufacturer's instructions.

#### 2.5. Transfections and reporter gene assays

For CPP conjugates,  $1.75 \times 10^5$  cells/well were seeded in 24-wells dishes with 10% FCS-containing medium. After overnight culture, the CPP conjugate were incubated at indicated concentrations for 4 h, in 1 ml optiMEM medium with the cells. The

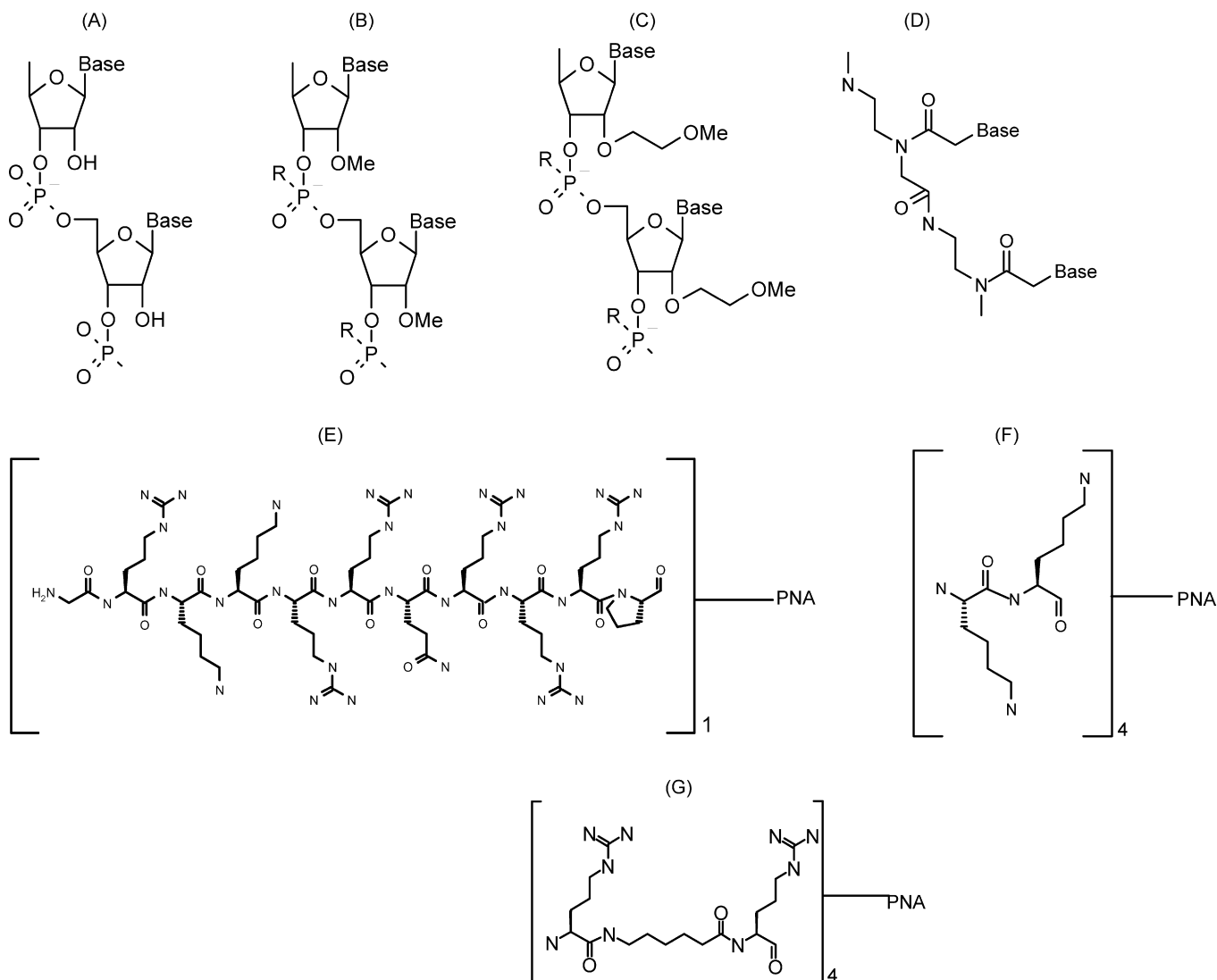


Fig. 1. Structure of oligonucleotides and peptides tested in this work. (A) RNA, (B) 2'-O-Me, (C) MOE, (D) PNA, (E) Tat-PNA, (F) K<sub>8</sub>-PNA, and (G) (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PNA, R = S (phosphorothioate) or O (phosphodiester).

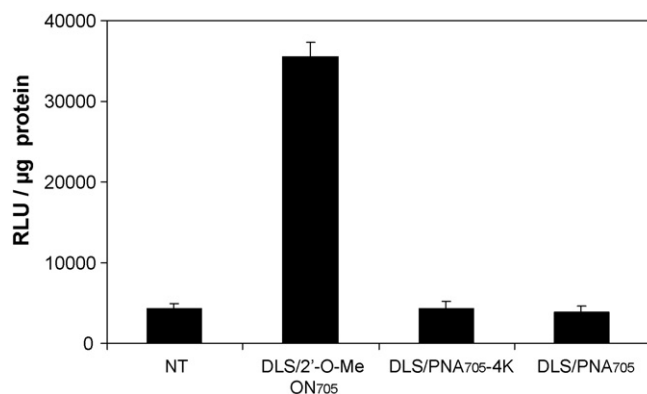


Fig. 2. Comparative study of splicing correction by DLS (for delivery liposomal system) lipoplexes complexed with various ON analogues. HeLa pLuc/705 cells were treated for 24 h in 10% serum-containing cell culture medium, with 200 nM 2'-O-Me ON<sub>705</sub> (negatively charged), PNA<sub>705</sub>-4K (positively charged) or PNA<sub>705</sub> (neutral), complexed to the DLS liposomes. NT, non-treated cells. Error bars show standard deviation ( $n=3$ ).

CPP conjugates were then diluted with 0.5 ml complete medium (FCS-containing medium) and luciferase activity was monitored 20 h later.

For lipoplexes,  $2.5\text{--}3.5 \times 10^5$  cells/well were seeded in 6-well dishes with 10% FCS-containing medium. After overnight culture, the cells were rinsed twice with PBS and the medium was replaced with DMEM medium-containing deplemented serum (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France). The lipoplexes were then added to the cells and luciferase activity was monitored 24 h later.

Following transfection, cells were rinsed twice with PBS and Reporter Lysis Buffer (Promega France, Charbonnières) was added. Protein concentrations in the extracts were measured by the BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Pierce, Perbio Science France, Brebieres) at 560 nm. Firefly luciferase activity was measured using a Luciferase Assay Kit (Promega) and was quantified in the supernatant with a Berthold Centro LB 960 luminometer (Berthold France SA, Thoiry). Luciferase activity in cultured cells was expressed as relative light units (RLU) per µg of protein. Each data point was averaged over three replicates.

## 2.6. Fluorescence microscopy

$5 \times 10^5$  cells/well were plated in 35 mm single wells. Following overnight culture, pLuc/705 HeLa cells were treated with the fluorescently FAM-labelled Tat-PNA<sub>705</sub> or with lipoplexes formulated with 5'-FITC-labelled 2'-O-Me ON<sub>705</sub> (aminohexanoic linker, Eurogentec SA, Seraing, Belgium), in optiMEM medium. Cells were rinsed twice with PBS. Living cells were directly observed in the dishes, in 1.5 ml of PBS supplemented with 5% FCS, after 1–24 h of transfection. Fluorescence distribution was analyzed on a Zeiss Axiovert 200M fluorescence microscope without fixation (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Images were first acquired with AxioVision software. After exportation, images were analyzed with Adobe Photoshop and ImageJ softwares.

## 3. Results

In order to compare CPP conjugation and lipoplex association as delivery strategies for steric-block ON, we have made use of the model initially proposed by Kang et al. (1998). This model is advantageous in providing a sensitive positive read-out over a low background when the correcting ON has been delivered in the nuclear compartment.

As already stated, the most currently used RNase-H-independent ON analogues described for splicing correction are either charged (2'-O-Me or MOE analogues) or neutral (PNA or PMO analogues) (Fig. 1) (DeLong et al., 1999; Kang et al., 1998; Sazani et al., 2001, 2002a).

As shown in Fig. 2, lipoplex formulation of 2'-O-Me ON<sub>705</sub> leads to a very significant increase in luciferase activity even at low concentration (200 nM in this experiment) while uncharged PNA<sub>705</sub> or positively charged PNA-4K<sub>705</sub> (in which a four lysine residues tail has been appended to PNA<sub>705</sub>) have no effect, as expected.

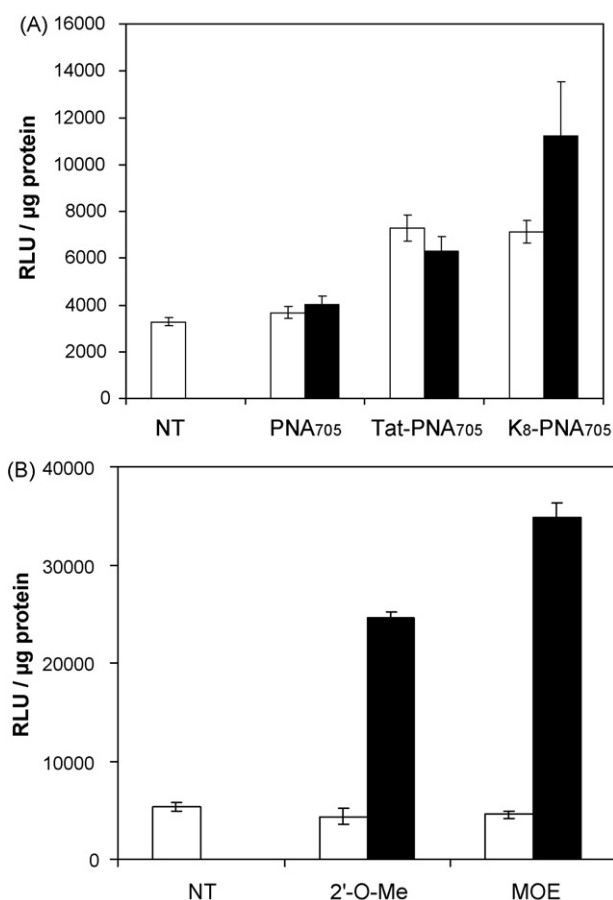


Fig. 3. Comparison of splicing correction by DLS or CPP-formulated ON analogues. (A) Splicing correction by PNA<sub>705</sub>, Tat-PNA<sub>705</sub> or K<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub> conjugates. HeLa pLuc/705 cells were incubated for 4 h in optiMEM in the absence or in the presence of 0.5 µM (white bars) or 1 µM (black bars) free PNA<sub>705</sub> or CPP-PNA<sub>705</sub> conjugates. Luciferase expression was quantified 20 h later. (B) Splicing correction by 2'-O-Me or MOE ON<sub>705</sub> analogues delivered with the DLS system. HeLa pLuc/705 cells were treated for 24 h in 10% serum-containing cell culture medium, with 100 nM 2'-O-Me SCR<sub>705</sub> or MOE NS<sub>654</sub> (white bars), or with 100 nM ON<sub>705</sub> (black bars). NT, non-treated cells. Error bars show standard deviation ( $n=3$ ).



Then, we compared in the same assay the splicing correction efficiencies of charged 2'-*O*-alkyl derivatives (2'-*O*-Me or MOE) formulated as lipoplexes and of neutral PNAs formulated as CPP conjugates (Fig. 3). In keeping with previous data from our group (Abes et al., 2006a; Richard et al., 2003), the stable conjugation of Tat<sub>48–60</sub> or of an oligolysine tail (K<sub>8</sub>-PNA<sub>705</sub>) to PNA<sub>705</sub> only gives rise to a very modest increase over the background level, even at 1  $\mu$ M concentration (Fig. 3A). On the contrary (Fig. 3B), the complexation of 2'-*O*-Me or MOE ON analogues to DLS lipoplexes leads to efficient and sequence-specific splicing correction even at the 100 nM concentration used in this experiment. At variance with most commercial cationic lipid formulations, DLS lipoplexes can be used even in the presence of serum proteins. The experiments described in Figs. 2 and 3B have indeed been performed in FCS-supplemented culture medium, e.g. in experimental conditions in which Lipofectamine<sup>TM</sup> is almost inefficient (data not shown and Thierry et al., 2006).

The intracellular fate of fluorescently tagged PNA or 2'-*O*-Me ON analogues delivered by Tat CPPs or by DLS lipoplexes, respectively, has then been followed by fluorescence microscopy of live cells. As shown in Fig. 4 (panels A–C), Tat-PNA conjugates essentially remain entrapped in cytoplasmic vesicles and little if any material can be detected in the nuclear compartment, thus explaining the poor biological response observed in the splicing correction assay. On the contrary, the DLS complexed 2'-*O*-Me ONs first appear as dotted cytoplasmic spots

(panels D–F) but accumulate in nuclei upon longer incubation times (Fig. 4 and data not shown).

Entrapment within endocytic vesicles thus appears as a major roadblock for CPP-conjugated steric-block ON analogues as pointed in several studies (Abes et al., 2006a, 2007; Bendifallah et al., 2006; El-Andalousi et al., 2006; Koppelhus et al., 2002; Kaihatsu et al., 2004; Richard et al., 2003; Shiraishi et al., 2005; Turner et al., 2005a). We recently developed a new arginine-rich delivery peptide (named (R-Ahx-R)<sub>4</sub>) which turned out more efficient for the delivery of PMO ON analogues (Abes et al., 2006b). As shown here, the stable chemical conjugation of (R-Ahx-R)<sub>4</sub> to PNA<sub>705</sub> does allow efficient splicing correction at low concentration (0.5–1  $\mu$ M) at variance with free PNA<sub>705</sub> or with Tat-PNA<sub>705</sub> (Fig. 5).

#### 4. Discussion

The splicing correction assay first described by Kang et al. (1998) is now recognized as one of the most reliable to evaluate the nuclear delivery of a steric-block ON analogue and as a consequence the efficacy of a delivery vector.

As documented here with this assay, 2'-*O*-Me ON analogues delivered as complexes with cationic lipids (DLS liposomes) correct splicing more efficiently than PNA oligomers delivered as CPP conjugates. A higher level of luciferase expression is indeed achieved with 100 nM of the 2'-*O*-Me ON/DLS formu-

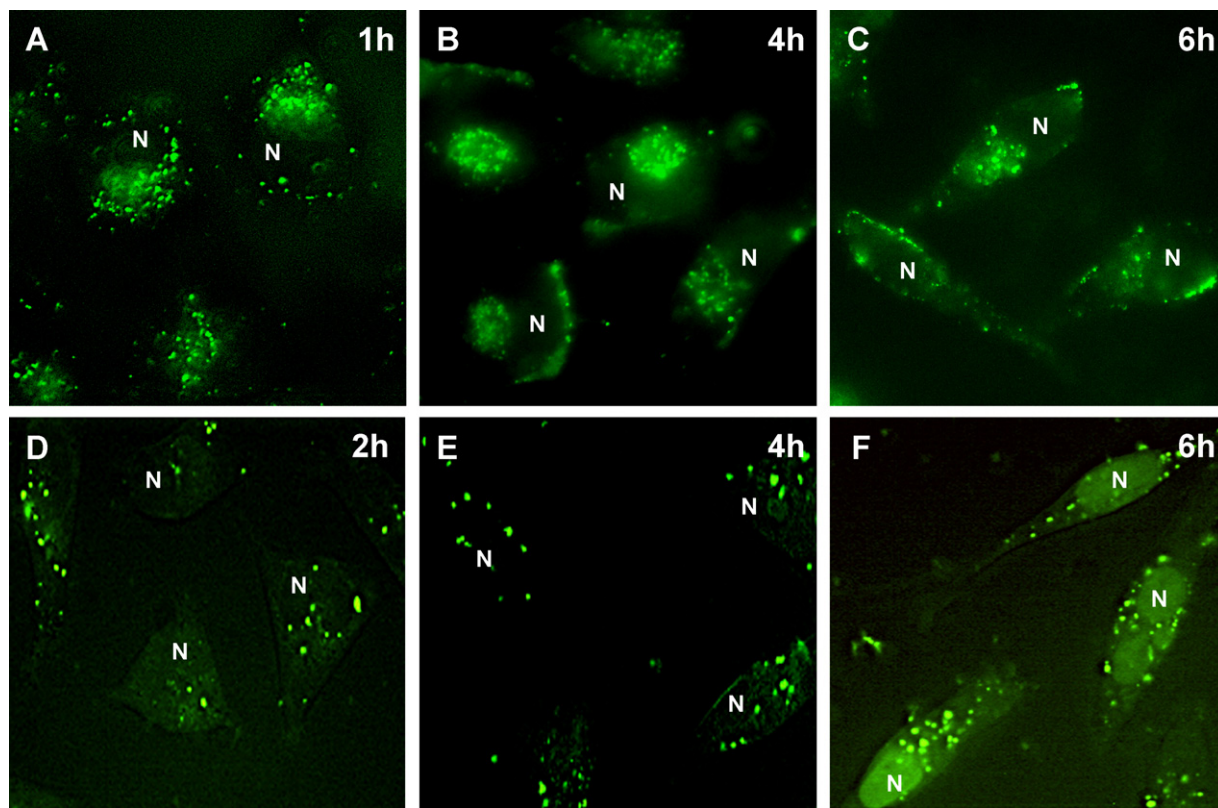


Fig. 4. Comparison of the intracellular distribution of DLS or Tat-formulated ON analogues. HeLa pLuc/705 cells were incubated with 1  $\mu$ M FAM-labelled Tat-PNA<sub>705</sub> conjugate (A–C) or with 200 nM FITC-labelled 2'-*O*-Me ON<sub>705</sub> delivered with the DLS system (D–F). Fluorescence microscopy images in live HeLa pLuc/705 cells incubated in optiMEM in presence of oligomers (green fluorescence) at indicated times. Living cells were directly observed in optiMEM supplemented with 5% FCS. N, nucleus. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

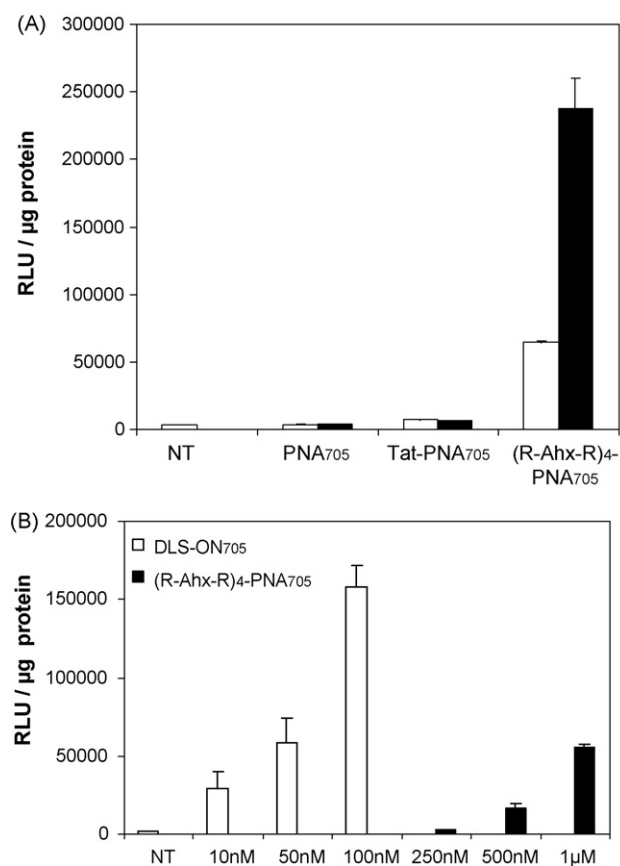


Fig. 5. Comparison of splicing correction efficiencies by naked PNA<sub>705</sub>, (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PNA<sub>705</sub> and Tat-PNA<sub>705</sub> at 0.5 µM (white bars) or 1 µM (black bars) (panel A) or by DLS-MOE ON<sub>705</sub> (white bars) and (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PNA<sub>705</sub> (black bars) at the indicated concentrations (panel B). HeLa pLuc/705 cells were incubated for 4 h in optiMEM in the absence or presence of oligomers at the indicated concentrations. Luciferase expression was quantified 20 h later. NT, non-treated cells. Error bars show standard deviation ( $n = 3$ ).

lation than with 1 µM of PNA-CPP conjugate (Figs. 3 and 5), in keeping with entrapment of PNA-CPP conjugates within endocytic vesicles (Fig. 4 and data not shown).

Increased splicing correction by DLS-formulated ON analogues is in line with more efficient release from endocytic vesicles and increased nuclear delivery as documented in Fig. 4. It is worth noticing here that 2'-O-Me and MOE ON derivatives hybridize with a lower affinity to complementary RNA and are metabolically less stable than neutral PNA and PMO analogues. Improving release of CPP-PNA or CPP-PMO conjugates for endocytic vesicles should therefore lead to very efficient splice correcting tools and is currently the object of structure-activity studies. Remarkably, these (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PNA and PMO conjugates have very low cytotoxicity which could be advantageous for further *in vivo* applications.

Whether DLS lipoplexes or CPP conjugates will be preferable for *in vivo* applications cannot be predicted and will depend on the outcome of experiments in plan in a  $\beta$ -thalassemic intron transgenic mouse model for the evaluation of splicing correction.

Particulate (DLS liposomes) and soluble (CPP conjugates) delivery vectors have each advantages and problems, depending on the application. Further optimization of delivery vectors

for steric-block ON will be critical for therapeutic intervention. As an example, exon skipping with mouse models of Duchenne muscular dystrophy has required very high doses of the free ON analogues (Alter et al., 2006; Fletcher et al., 2006) and commercial cationic lipid formulations have turned rather cytotoxic (Gebbski et al., 2003).

## Acknowledgements

We thank G. Ivanova, D. Owen and D. Williams (MRC Cambridge) for contributions to the synthesis of PNA peptides, as well as R. Kole (University North Carolina) for providing pLuc/705 cell line and MOE ON analogues. Studies funded by EEC grant QLK3-CT-2002-01989 and CEFIPRA grant 3205. S. Abes had a pre-doctoral fellowship from the Ligue Regionale contre le Cancer and S. Resina from the Association pour la Recherche sur la Cancer.

## References

- Abes, S., Williams, D., Prevot, P., Thierry, A.R., Gait, M.J., Lebleu, B., 2006a. Endosome trapping limits the efficiency of splicing correction by PNA-oligolysine conjugates. *J. Control. Release* 110, 595–604.
- Abes, S., Moulton, H.M., Clair, P., Prevot, P., Youngblood, D.S., Wu, R.P., Iversen, P.L., Lebleu, B., 2006b. Vectorization of morpholino oligomers by the (R-Ahx-R)<sub>4</sub> peptide allows efficient splicing correction in the absence of endosomolytic agents. *J. Control. Release* 116, 304–313.
- Abes, S., Moulton, H., Turner, J., Clair, P., Richard, J.P., Iversen, P., Gait, M.J., Lebleu, B., 2007. Peptide-based delivery of nucleic acids: design, mechanism of uptake and applications to splice-correcting oligonucleotides. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 53–55.
- Alter, J., Lou, F., Rabinowitz, A., Yin, H., Rosenfeld, J., Wilton, S.D., Partridge, T.A., Lu, Q.L., 2006. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat. Med.* 12, 175–177.
- Bendifallah, N., Rasmussen, F.W., Zachar, V., Ebbesen, P., Nielsen, P.E., Koppelhus, U., 2006. Evaluation of cell-penetrating peptides (CPPs) as vehicles for intracellular delivery of antisense peptide nucleic acid (PNA). *Bioconjugate Chem.* 17, 750–758.
- DeLong, R.K., Yoo, H., Alahari, S.K., Fisher, M., Short, S.M., Kang, S.H., Kole, R., Janout, V., Regan, S.L., Juliano, R.L., 1999. Novel cationic amphiphiles as delivery agents for antisense oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.* 27, 3334–3341.
- El-Andaloussi, S., Johansson, H.J., Lundberg, P., Langel, U., 2006. Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids. *J. Gene Med.* 8, 1262–1273.
- Fletcher, S., Honeyman, K., Fall, A.M., Harding, P.L., Johnsen, R.D., Wilton, S.D., 2006. Dystrophin expression in the mdx mouse after localised and systemic administration of a morpholino antisense oligonucleotide. *J. Gene Med.* 8, 207–216.
- Gebbski, B.L., Mann, C.J., Fletcher, S., Wilton, S.D., 2003. Morpholino antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 23 skipping in mdx mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1801–1811.
- Kaihatsu, K., Huffman, K.E., Corey, D.R., 2004. Intracellular uptake and inhibition of gene expression by PNAs and PNA-peptide conjugates. *Biochemistry* 43, 14340–14347.
- Kang, S.H., Cho, M.J., Kole, R., 1998. Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry* 37, 6235–6239.
- Kole, R., Vacek, M., Williams, T., 2004a. Modification of alternative splicing by antisense therapeutics. *Oligonucleotides* 14, 65–74.
- Kole, R., Williams, T., Cohen, L., 2004b. RNA modulation, repair and remodeling by splice switching oligonucleotides. *Acta Biochim. Pol.* 51, 373–378.

- Koppelhus, U., Awasthi, S.K., Zachar, V., Holst, H.U., Ebbeson, P., Nielsen, P.E., 2002. Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucl. Acid Drug. Dev.* 12, 51–63.
- Lavigne, C., Thierry, A.R., 1997. Enhanced antisense inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in cell cultures by DLS delivery system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 566–571.
- Lavigne, C., Yelle, J., Sauve, G., Thierry, A.R., 2001. Lipid-based delivery of combinations of antisense oligodeoxynucleotides for the *in vitro* inhibition of HIV-1 replication. *AAPS PharmSci.* 3, E7.
- Lavigne, C., Lunardi-Iskandar, Y., Lebleu, B., Thierry, A.R., 2004. Cationic liposomes/lipids for oligonucleotide delivery: application to the inhibition of tumorigenicity of Kaposi's sarcoma by vascular endothelial growth factor antisense oligodeoxynucleotides. *Methods Enzymol.* 387, 189–210.
- Lu, Q.L., Rabinowitz, A., Chen, Y.C., Yokota, T., Yin, H., Alter, J., Jadoon, A., Bou-Gharios, G., Partridge, T., 2005. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 198–203.
- Mercatante, D.R., Sazani, P., Kole, R., 2001. Modification of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy for cancer and other diseases. *Curr. Cancer Drug Targets* 1, 211–230.
- Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V., Lebleu, B., 2003. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 278, 585–590.
- Sazani, P., Kang, S.H., Maier, M.A., Wei, C., Dillman, J., Summerton, J., Manoharan, M., Kole, R., 2001. Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs. *Nucl. Acids Res.* 29, 3965–3974.
- Sazani, P., Gemignani, F., Kang, S.H., Maier, M.A., Manoharan, M., Persmark, M., Bortner, D., Kole, R., 2002a. Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues. *Nat. Biotechnol.* 20, 1228–1233.
- Sazani, P., Vacek, M.M., Kole, R., 2002b. Short-term and long-term modulation of gene expression by antisense therapeutics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 468–472.
- Sazani, P., Kole, R., 2003. Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing. *J. Clin. Invest.* 112, 481–486.
- Schmutz, M., Durand, D., Debin, A., Palvadeau, Y., Etienne, A., Thierry, A.R., 1999. DNA packing in stable lipid complexes designed for gene transfer imitates DNA compaction in bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12293–12298.
- Shiraishi, T., Pankratova, S., Nielsen, P.E., 2005. Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic Tat and oligoarginine peptides. *Chem. Biol.* 12, 923–929.
- Tavitian, B., Marzabal, S., Boutet, V., Kuhnast, B., Terrazzino, S., Moynier, M., Dolle, F., Deverre, J.R., Thierry, A.R., 2002. Characterization of a synthetic anionic vector for oligonucleotide delivery using *in vivo* whole body dynamic imaging. *Pharm. Res.* 19, 367–376.
- Thierry, A.R., Rabinovich, P., Peng, B., Mahan, L.C., Bryant, J.L., 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., Vives, E., Richard, J.-P., Prevot, P., Martinand-Mari, C., Robbins, I., Lebleu, B., 2003. Cellular uptake and intracellular fate of antisense. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 5, 133–138.
- Thierry, A.R., Abes, S., Resina, S., Travo, A., Richard, J.P., Prevot, P., Lebleu, B., 2006. Comparison of basic peptides- and lipid-based strategies for the delivery of splice correcting oligonucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 364–374.
- Turner, J.J., Ivanova, G.D., Verbeure, B., Williams, D., Arzumanov, A.A., Abes, S., Lebleu, B., Gait, M.J., 2005a. Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. *Nucl. Acids Res.* 33, 6837–6849.
- Turner, J.J., Arzumanov, A.A., Gait, M.J., 2005b. Synthesis, cellular uptake and HIV-1 Tat-dependent trans-activation inhibition activity of oligonucleotide analogues disulphide-conjugated to cell-penetrating peptides. *Nucl. Acids Res.* 33, 27–42.
- Youngblood, D.S., Hatlevig, S.A., Hassinger, J.N., Iversen, P.L., Moulton, H.M., 2007. Stability of cell-penetrating peptide-morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells. *Bioconjugate Chem.* 18, 50–60.

## ARTICLE V

**« Les propriétés physico-chimiques des lipoplexes influencent les mécanismes d'internalisation cellulaire et l'activité de transfection des oligonucléotides »**

En préparation



## I. INTRODUCTION.

Plusieurs formulations à base de liposomes complexés à des ON antisens sont comparées dans cet article :

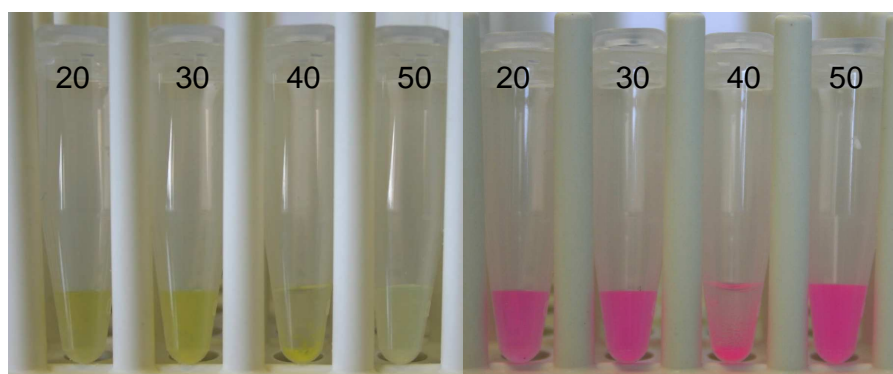
◆ lipoplexes cationiques : DLS et  $Nx \oplus$

◆ lipoplexes anioniques :  $Nx \ominus$ .

Les  $Nx$  ont été les 1<sup>ers</sup> lipoplexes de charge globale nette négative, stables et efficaces pour la transfection d'AN. Leur avantage consiste essentiellement en leur plus grande stabilité sérique, conduisant à une plus large biodistribution et à une plus faible élimination, tel qu'il a été démontré après administration i.v. chez les babouins (Tavitian *et al.* 2002). Ils possèdent la même ultrastructure spécifique hautement ordonnée que les DLS.

Le système de formulation  $Nx$  permet d'obtenir des complexes soit globalement positifs, soit proches de la neutralité ou soit négatifs, en fonction de la quantité d'AN à complexer au sein de la formulation (voir Figure 34). La formation de particules globalement neutres et stables est physico-chimiquement impossible. Les complexes constitués de 20 et 30 $\mu$ g d'ON sont globalement positifs. Pour 40 $\mu$ g d'ON (marqués avec un fluorophore FITC ou Alexa<sub>546</sub>) par dose de  $Nx$ , un culot est observé, correspondant à une zone de neutralité de la formulation. Pour les ON non marqués avec un fluorophore (2'O-Me, MOE), cette zone de neutralité a été observé entre 25 et 30 $\mu$ g d'ON (Resina *et al.* en préparation). Les complexes constitués de 50 $\mu$ g, et plus, sont chargés négativement.

**Figure 34** : *particules de  $Nx$  complexées à diverses quantités d'ON-FITC (fluorescence verte, à gauche) ou ON-Alexa<sub>546</sub> (fluorescence rouge, à droite). Quantités d'ON exprimées en  $\mu$ g par dose de  $Nx$ .*



Ces formulations sont comparées à plusieurs niveaux :

- ◆ efficacité de vectorisation par mesure de la protéine luciférase : analyse quantitative par luminométrie,
- ◆ efficacité de la vectorisation par mesure de l'ARNm : analyse qualitative par RT-PCR,
- ◆ voie de pénétration dans la cellule : analyse quantitative par FACS,
- ◆ localisation intracellulaire : analyse qualitative par microscopie à fluorescence,
- ◆ cytotoxicité : analyse qualitative par test MTT.

Dans un 1<sup>er</sup> temps, nous analyseront les différences d'observation entre les mêmes formulations de Nx mais chargées différemment (Nx  $\oplus$  et Nx  $\ominus$ ). Dans un 2<sup>ème</sup> temps, nous allons pouvoir comparer les formulations DLS vis-à-vis des Nx. Enfin, la voie de pénétration ainsi que la localisation intracellulaire des ON seront étudiées en fonction du milieu utilisé (en présence ou absence de sérum) et du temps de transfection (1, 3 et 6h). Un protocole original de FACS a ainsi été mis au point et utilisé afin d'évaluer la proportion (%) de fixation à la membrane, de transport actif (type endocytose principalement) et de transport passif (type fusion principalement) des liposomes DLS, Nx  $\oplus$  et Nx  $\ominus$  complexés à des ON 2'O-Me-FITC (voir Tableau 10). Le traitement ou non à la glycine (0.2 M, pH=2.8), a permis de détacher les particules fixées à la membrane, afin de déterminer la part de fixation des complexes à la membrane cellulaire (Loke *et al.* 1989, Thierry *et al.* 1992). Les cellules ont été traitées à 37°C ou à 4°C sur la glace, permettant d'évaluer la proportion de transport actif et de transport passif. Pour les calculs, la valeur de la Gm (moyenne de fluorescence géométrique) a été utilisée, retranchée à celle des cellules non traitées.

**Tableau 10** : conditions des expériences pour évaluer la part de transport actif, de transport passif et de fixation à la membrane des lipoplexes.

TA= transport actif. TP= transport passif. F= fixation à la membrane cellulaire.

TEMPERATURE D'INCUBATION	TRAITEMENT OU NON A LA GLYCINE	VALEUR / MECANISME(S) OBSERVE(S)	EVALUATION DE LA PART DE
4°C	Oui	A = TP	TP
4°C	Non	B = TP + F	F = B - A
37°C	Non	C = TP + F + TA	TA = C - B

Pour lier l'efficacité de vectorisation au type de formulation (DLS, Nx  $\oplus$ , Nx  $\ominus$ ), la taille des particules (liposomes et lipoplexes) par Dynamic Light Scattering, ainsi que leur potentiel zêta ( $\zeta$ ) ont été mesurés.

## II. CONTRIBUTION.

Dans cet article, j'ai effectué la totalité des expériences, excepté celles de microscopie qui ont été réalisées par Paul PREVOT. La formulation des Nx au sein du laboratoire a demandé une phase de mise au point, qui a été entreprise avec l'aide d'Alain THIERRY.

## III. CONCLUSION.

### ◆ Taille des particules et potentiel zêta des liposomes et lipoplexes.

Les liposomes (DLS et Nx) ont une taille moyenne entre 130 et 170 nm et les lipoplexes de 180 à 280 nm. D'une façon générale, les particules de liposomes et de Lx ont une répartition de type monomodale, témoignant de particules relativement de taille homogène, et également stables au cours du temps (mesures jusqu'à 4 mois après formulation, données non publiées). La mesure du potentiel zêta montre que les complexes DLS sont plus cationiques (+ 43.5 mV) que les complexes Nx  $\oplus$  (+ 21.8 mV), et que les complexes Nx  $\ominus$  (-37.2 mV) sont de charge négative comme attendu.

### ◆ Rapports de charges des complexes.

Nous avons aussi calculé le rapport entre les charges positives correspondant aux lipides et les charges négatives correspondant aux AN, appelé rapport global net de charges (Felgner *et al.* 1997) : c'est la charge globale totale des particules complexes, qui peut différer de la charge de surface mesurée grâce au potentiel zêta. La charge du DOGS est de 3 charges positives et celle du DOSPA présent dans la LFA est de 4 charges positives. La molécule de CL possède 1 charge négative. Nous avons obtenu ces valeurs pour les diverses formulations utilisées (Meryet-Figuières *et al.* 2007, Resina *et al.* 2007a) :

- Nx- 40 = 1.0
- Nx+ 20 = 2.0
- DLS = 7.3
- LFA = 13.5

D'après ce qui a déjà été observé, il semblerait que ce rapport de charge soit proportionnel à la toxicité engendrée *in vitro*. Ces résultats suggèrent donc que les Nx40

(chargés négativement) sont les lipoplexes les moins toxiques, ce qui a été confirmé par les tests de cytotoxicité MTT. Ils expliquent aussi pourquoi la LFA est plus toxique que les Nx et les DLS, lorsque celle-ci n'est pas inhibée par les protéines sériques en milieu optiMEM. L'agrégation aux environs de la neutralité provient de la charge de surface des particules. Dans le cas des ON marqués au FITC (fluorophore à caractère hydrophobe), la zone de neutralisation apparaît à un rapport global net de charge inférieur ( $\approx 1.5$  fois) à celui conduisant à l'agrégation des lipoplexes DLS contenant les ON non marqués. Cette variation de la zone de neutralisation semblant varier selon la nature de l'ON et de ses modifications, a été observée, entre autres, clairement lorsque des double-brins d'ARN (siRNA) ont été utilisés (Meryet-Figuières *et al.* 2007).

#### ◆ Efficacité de vectorisation des Lx.

Globalement, les Nx  $\oplus$  et Nx  $\ominus$  sont plus efficaces en milieu sérum que les DLS. Moins chargés que les DLS, les complexes de Nx  $\oplus$  et Nx  $\ominus$  se lient moins aux protéines sériques que les DLS, chargés très positivement. Par contre, les Nx s'avèrent moins efficaces que les DLS en milieu optiMEM. D'une façon générale, les complexes proches de la neutralité sont plus efficaces que les complexes plus chargés, qu'ils soient positifs ou négatifs.

#### ◆ Localisation intracellulaire des Lx.

Comme pour le système DLS, les ON-FITC délivrés par le système Nx  $\oplus$  sont localisés d'abord dans le cytoplasme (données non publiées) puis essentiellement dans le noyau des cellules au bout de 5h (colocalisation avec le Hoechst) (Thierry *et al.* 2006). La même distribution a été observée pour les ON complexés aux Nx  $\oplus$  et aux Nx  $\ominus$  (données non publiées). La localisation intracellulaire et particulièrement le tropisme nucléaire des ON ne semblent donc pas dépendre du type de formulation, ni de la charge des Lx.

#### ◆ Cytotoxicité des Lx.

Les Nx  $\oplus$ -2'O-Me<sub>705</sub> présentent une cytotoxicité significative à partir de 1 $\mu$ M d'ON en milieu avec sérum, 500nM en milieu sans sérum. Pour les Nx  $\ominus$ -2'O-Me<sub>705</sub>, on retrouve cette cytotoxicité pour 1 $\mu$ M dans l'optiMEM, mais aucune toxicité n'est retrouvée dans le DMEM, même pour 1 $\mu$ M d'ON. Les particules de Nx chargées négativement sont donc moins cytotoxiques *in vitro* que les mêmes particules chargées positivement. Les DLS, plus cationiques, présentent une cytotoxicité significative dans l'optiMEM à partir de 100nM

d'ON seulement : ils sont donc plus toxiques que les Nx *in vitro*. Cependant, ils ne le sont pas du tout en milieu sérum : il est vraisemblable que leurs charges en surface attirent trop les protéines sériques, chargées elles négativement, conduisant à des complexes de plus faible charge ou à leur déstabilisation.

♦ Voies de pénétration des Lx dans la cellule.

Il semble que les proportions de transport passif, de transport actif et de fixation à la membrane varient en fonction (voir Tableau 11) :

- du temps d'incubation des complexes,
- du milieu de transfection,
- de la charge des complexes, et
- du type de formulation.

**Tableau 11** : récapitulatif des mécanismes observés en fonction de la charge des Lx et du milieu de transfection. ↑, augmente. ↓, diminue.

<b>LORSQUE</b>	<b>Lx / CHARGE DES Lx</b>	<b>MILIEU DE TRANSFECTION</b>	<b>ALORS</b>	<b>MECANISME</b>
	Charge négative ↑			Fixation ↓
	Charge négative ↑			Transport passif ↑
	Charge positive ↑			Transport actif ↑
		DMEM sérum		Fixation ↑ en fonction du temps
	DLS	optiMEM		Transport actif ↑
	Charge positive ↑	optiMEM		Activité ↑
	Charge négative ↑	DMEM sérum		Activité ↑
	Quantité ON / mg lipide ↑			Activité ↑

Brièvement, il n'y a quasiment pas de fixation à la membrane des Nx  $\ominus$  dans l'optiMEM (entre 0 et 2%) et on retrouve la part de transport passif la plus importante pour 6h (67%). En général, il y a beaucoup plus de transport actif que passif pour les particules cationiques, surtout pour les DLS et les Nx  $\oplus$  dans l'optiMEM (62 et 66%, respectivement pour 3h et 6h) ; mais il y en a aussi pour les Nx  $\ominus$  dans le milieu sérum (62%). Il y a une part importante d'endocytose pour les particules anioniques, ce qui signifie que le transport actif

ne concerne pas uniquement les particules cationiques : l'endocytose n'est pas forcément médiée par les protéoglycans (chargés négativement) de la membrane cellulaire.

***IV. ARTICLE V.***

**The physico-chemical properties of the lipoplexes effect the mechanisms of cell uptake and oligonucleotide transfection activity.**

Resina S., Prevot P., Lebleu B. and Thierry A.R.

*En préparation.*

**THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES  
OF THE LIPOPLEXES INFLUENCE THE MECHANISMS OF CELL UPTAKE  
AND THEIR OLIGONUCLEOTIDE TRANSFECTION ACTIVITY**

Sarah Resina<sup>1</sup>, Paul Prevot<sup>1</sup>, Bernard Lebleu<sup>1</sup> and Alain R. Thierry<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques (DIMNP), Département de Défenses Antivirales et Antitumorales - UMR 5235 - CC107 - Université de Montpellier II, Place Eugène Bataillon - 34095 MONTPELLIER cedex 5, FRANCE

<sup>2</sup> Modélisation et Ingénierie des Systèmes complexes biologiques pour le Diagnostic (SysDiag) - FRE 3009 CNRS / Bio-Rad - Cap Delta, 1682 rue de la Valsière, BP 61003 - 34184 MONTPELLIER cedex 4, FRANCE

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 16 66 20; Fax: +33 4 67 16 66 01.

*E-mail address:* [alain.thierry@sysdiag.cnrs.fr](mailto:alain.thierry@sysdiag.cnrs.fr)

**ABSTRACT**

Formulation of DNA/cationic lipid complex (lipoplex, Lx) designed for nucleic acid delivery mostly results in positively charged particles which are thought to enter cells by an endocytic pathway. We recently developed an Lx formulation termed Neutraplex allowing preparation of cationic as well as anionic stable Lx particles exhibiting the same lipids content and ultrastructure. This Lx system made possible to delineate the Lx cell uptake mechanisms upon their global net charge and the follow-on effect on oligonucleotide (ON) transfection activity. Toward this goal, we prepared Lx of various charges and compared: (i) the physicochemical properties by zeta potential analysis and by dynamic light scattering, (ii) cell uptake by fluorescence microscopy and flow cytometry, and (iii) the biological activity of the transported ON by measuring correction of the thalassemic  $\beta$ -globin splicing alteration in a positive readout cell culture experimental model. Such Lx particles, either positively or negatively charged, are able to transfect cells following an active uptake mechanism (observed at 37°C) and a passive mechanism (observed at 4°C). ON, delivered within anionic Lx, show high activity in serum-containing medium whereas use of highly positively charged Lx and optiMEM medium are the best conditions to obtain the highest activity in cultured cells. On the whole, increasing negative charges in Lx led to a decrease in membrane binding as well as in passive transport, while increasing ON activity when serum is present in transfection medium. Increasing positive charges in Lx led to an increase of active transport while increasing ON activity solely in optiMEM transfection medium. Lx may enter cell by another pathway than endocytosis (active transport), we believe to be mediated by lipid fusion (passive transport) as suggested by confocal microscopy. Such fusogenic property might rise from specific Lx ultrastructure and should be taken into consideration when developing Lx designed for *in vivo* or *ex vivo* nucleic acid transfer.

*Keywords:* antisense, lipoplex, splicing correction, endocytosis, fusion, uptake



## INTRODUCTION

Non viral DNA delivery systems have been developed to facilitate the entry of genes into mammalian cells. Among the polycharge-based vectors used, cationic DNA complexes (lipoplexes) [1] seem promising candidates since they deliver nucleic acids efficiently both in vitro and in vivo [1, 2, 3, 4]. They represent nowadays 8% of gene therapy clinical trials to deliver genes, active molecules or drugs ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical/](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/)). Despite several studies investigating the mechanisms of uptake and intracellular trafficking of non viral vectors, current understanding of the processes involved in the cellular uptake of lipoplexes (Lx) is still limited.

Eukaryotic cells utilize several endocytic pathways to internalize a variety of substances and to accomplish different tasks. It is generally assumed that Lx predominantly enter cells by endocytosis [5, 6, 7, 8]. Several endocytic pathways are implicated: the clathrin-dependent pathway [9]; phagocytosis [10]; macropinocytosis [11]; caveolin-dependent pathway [12]. Phagocytosis is restricted to specialized cells including macrophages, monocytes and neutrophils [13]. Macropinocytosis, mainly described for polyplexes, is less common for Lx. Type of endocytosis was shown to depend upon the particle size [14]. In receptor-mediated endocytosis, small particles (< 250 nm) are mainly internalized by the clathrin-mediated pathway, a non specific mechanism. This pathway is initiated by the formation of clathrin-coated pits and leads to the formation of early and late endosomes, which ultimately fuse with lysosomes [15]. Larger particles ( $\geq$  500 nm) generally enter cells through caveolae [13, 14].

Although endocytosis has been proposed as the main pathway for lipoplex entry, a fusion and energy independent pathway has been proposed in a few studies [16, 17]. An exchange mechanism could occur between lipids of the lipoplex and plasma membranes, thus leading to nucleic acids delivery directly in cells cytoplasm [1, 18].

Using negatively charged particles is usually advantageous for systemic administration, because of (i) the pharmacological inactivation by serum protein [3], (ii) first pass distribution [19] and (iii) toxicity of cationic lipoplex. Neutrplex (Nx) was the first described system making possible the production of stable negatively charged Lx particles [20]. While maintaining high nucleic acid transfection efficiency, Nx showed to be well distributed and less rapidly cleared following i.v. administration in monkeys [3].

We have recently made use of a splicing correction assay [21] to monitor the delivery of modified 2'O-methyl-oligoribonucleotides (2'O-Me ON) with Lx formulations. The assays based on the insertion of the mutated intron 2 of the human  $\beta$ -globin gene within the coding sequence of a luciferase reporter gene. The activation of a cryptic splice site in this intron prevents its complete removal unless the mutated site is masked by a steric-block ON analogue, such as 2'O-Me ON. Splice switching requires the sequence-specific binding of nuclease-resistant and high affinity RNase-H incompetent ON analogues to pre-mRNA. Charged phosphodiester 2'O-Me ON were shown to be good candidates to correct splicing [22, 23].

Here we studied in which extent Lx surface charge influences cell internalization pathway. For this, we used the Neutraplex delivery system [3, 20] which makes possible to prepare positively or negatively charged particles while exhibiting the same lipid composition and structure. Due to its unique formulation procedure, we could directly compare 2'O-Me ON cell delivery by analysing uptake pathway, intracellular distribution and Lx/ON efficacy in correcting splicing alteration.

## RESULTS

Liposomes formulated or not with the 2'O-Me ON<sub>705</sub> were compared by measuring the particle size range by Dynamic Light Scattering and thus surface charge by zeta potential (Table 1). High homogeneous particles were obtained both with DLS and Nx formulations, with a mean of 137 (149 width) and 170 nm (22 width) respectively. DLS Lx exhibited a mean size of 179 nm (25 width) and a zeta potential of + 43.5 mV, cationic Nx Lx (Nx+) 278 nm (100 width) and + 21.8 mV and anionic Nx Lx (Nx-) 203 nm (100 width) and - 37.2 mV. No particles larger than 600 nm were detected in any samples. Global net charge ratios of positive charges in DOGS to negative charges in cardiolipin (CL) and ON were calculated. Global net charge ratios of 1.8 for Nx+ 20 and 1.0 for Nx- 40 were obtained, suggesting that Nx- is the lipoplex preparation closest to neutrality. In comparison, we obtained a ratio of 7.3 for the DLS formulation system.

A tetrazolium-based colorimetric assay showed a cytotoxicity in optiMEM medium from 100 nM ON<sub>705</sub> for the DLS system (Fig. 1A), 500 nM for Nx+ (Fig. 1B) and 1  $\mu$ M for Nx- (Fig. 1C), after a 24 h transfection. No significant cytotoxicity was observed in serum-containing medium for the three Lx formulations. In addition, no decrease of protein amounts compared to untreated cells under these conditions was observed.

As shown in Fig. 2, after 5 h incubation FITC-labelled ON<sub>705</sub> (green fluorescence) distributed in the cytoplasm and in the cell nuclei. As already stated, the ON first distribute in endocytotic vesicles, corresponding to a punctate staining in the cytoplasm, and then accumulate in the nuclei [22, 23, 24] especially in nucleoli [24, 25].

Our experimental protocol evaluating by FACS ON cell penetration upon 4C° or 37C° incubation solely distinguish between active and passive process. Active transport of particles of mean diameter lower than 500 nm mostly correspond to an endocytic mechanism. It is established that endocytosis pathway is temperature dependant and does not occur at temperature below 4C°. Usually studies on particles cell uptake are performed by using conventional and specific markers of the late and medium endocytosis which respective contribution is not the purpose of our study. In addition, use of endocytic inhibitors such as chloroquine or NaN<sub>3</sub> are very helpful for studying drug intracellular release as we did in our laboratory for cell penetrating peptides [26] but we arbitrarily decided to focus on plasma membrane penetration. Passive transport through plasma membrane such as lipid membrane fusion can not be specifically detected by specific markers or estimated by using specific inhibitors.

Measurement of fluorescence intensity using FACS of cells previously treated with labelled particles must be cautiously analyzed when studying cell uptake. An original calculation was here set to discriminate the contributions of active and passive Lx transport. In order to differentiate non specific ON binding on cell membrane from lipid fusion within cell membrane, we used here a glycine buffer (0.2 M, pH 2.8) able to strip off surface bound ON. In addition to earlier demonstration of the efficacy of this method [18, 27], our data corroborate it as, for instance, glycine buffer treatment of 1 h Nx+/ON treated cells in optiMEM culture medium led to more than 71% decrease in total ON associated fluorescence (Fig.3B). In contrast, when cells are incubated with Nx-ON in optiMEM culture medium for 1 h, subsequent glycine treatment did not at all decrease fluorescence intensity (Fig.3D). This shows efficient cell surface bound ON stripping off by the glycine cell treatment allowing discrimination between various levels of cell surface binding. By carrying out incubation at 4 or at 37°C, it is well established that we can determine cell membrane active transport contribution. Thus, combining incubation at 4 or at 37°C and treatment with glycine, allowed us to discriminate the contributions of passive and active transport in Lx cell uptake.

There is no or poor cell surface binding of Nx-ON when incubating cells in optiMEM while passive transport appears the major uptake mechanism for this formulation at 1, 3 and 6 h incubation (55, 56 and 67% of total fluorescence intensity, respectively) (Fig. 4B). Active transport appears to decrease with time of incubation (from 62 to 23 % for 1 to 6 h incubation, respectively). When using Nx+ for delivering labelled ON in serum-containing DMEM medium, active transport appears to increase with time of incubation (from 8 to 65% for 1 to 6 h incubation, respectively) while surface bound fluorescence highly decreased (from 71 to 7%). There is no much variation of the respective contribution of cell fluorescence associated with active transport, passive transport and cell surface bound with a 25-31%, 25-42% and 22-41% ranges, respectively, when incubating cells with Nx+/ON in serum-containing medium. Cell-associated fluorescence did not increase between 3 and 6 h incubation with anionic Lx whatever serum is used or not, in contrast to cell-associated fluorescence of cell treated with Nx+ (doubling within this time period).

More precisely, when using Nx+ it is noticeable that: (i), cell surface-bound fluorescence of DMEM incubated cells is very low (< 6% of total cell-associated fluorescence) within the first 3 h of incubation and increasing later (36%), whereas it corresponds to a high proportion in optiMEM incubated cells (95%, 45%, 46% at 1, 3, and 6 h incubation, respectively) representing up to 10-fold increase compared with DMEM incubated cells; (ii), active transport increase within 1-6 h incubation period and represent approximately the double of

fluorescence intensity compared with passive transport; (iii), level of passive transport was similar in optiMEM or in DMEM and did not increase after 3 h incubation.

In addition to the quantitative determination of passive and active transport, fluorescence microscopy data buttress the notion that Lx may significantly enter cell by a passive mechanism. Following 1 h incubation with 250 nM Alexa-labelled ON (red fluorescence) complexed to FITC-labelled Nx lipids in optiMEM (Fig. 5), we observed both a diffused staining in the cytoplasm and a localized staining in the plasma membrane of the labelled lipid (DOPE) from Lx into cell membrane, suggesting fusion and displacement of the lipid within the membrane. Intracellular ON staining appears limited to endosome entrapment within this short incubation period. However, ON might diffuse into cells following fusion process and is not detected by fluorescence, probably due to low local concentration at this early time point of incubation. This shows that Lx uptake is a rapid and efficient process involving two major mechanisms: an active and a passive transport.

We used the Nx system, using the splicing correction model by 2'O-Me ON<sub>705</sub> in the HeLa pLuc/705 [21]. For the Nx system, we observed a charge neutralization phase between Nx25 and Nx30, corresponding to 25 or 30 µg ON mixed with 156 µg total lipids. Cell incubation in serum-containing medium for 24 h with 100 nM ON cationic Nx20 appears to be the most efficient condition, measuring luciferase protein activity (Fig. 6A) or luciferase mRNA (Fig. 7A). Splicing correction activity of Nx20/ ON<sub>705</sub> appears at a similar level in optiMEM while it is higher than negatively charged Nx30 or Nx40/ ON<sub>705</sub>. Cell treatment with more highly cationic DLS/ON<sub>705</sub> led to an efficient splicing correction with the DLS system (Fig. 6C, 7B) in the same conditions. In Fig.6C, we compared the DLS delivery system to the Nx, in presence or absence of serum-containing medium. After 24 h incubation with 100 nM DLS-AS were shown to have the optimal activity, compared to DLS-SC. DLS and Nx had similar activities in DMEM medium but, as previously observed in Fig. 7B, the DLS system is 8-fold more efficient than Nx20 in absence of serum.

## DISCUSSION

Lx formation is based on the counterion Manning-Oosawa reaction leading to compaction in nucleic acids (NA)/lipid complex which, under specific preparation processes, generate small and stable particles. To ensure complete DNA or ON counterion condensation, excess of positive charges is needed to obtain stable complexes for most previously described Lx preparation. Thus, numerous Lx of cationic nature have been developed and, among those, various commercially available systems are very successful in transfecting *in vitro* cultured cells.

However, cationic Lx exhibit significant drawbacks when considering *in vivo* delivery. Blood contains plasma proteins carrying anionic charges that may non-specifically bind to positively-charged Lx, rapidly removing them from circulation via the reticuloendothelial system. Plasma proteins might also greatly alter lipid/NA complex structure leading to aggregation and enhanced clearance or deterioration by serum nucleases. Opsonization and activation of the complement system [28] by Lx are additional physiological phenomena that participate in lowering the intravenous (i.v.) efficacy of cationic Lx. Pharmacokinetic analyses of lipid-based delivery systems have revealed that, in the case of systemic administration, movement from the circulation to organs is largely an unidirectional process and governed in large part by the size of the complexes. Thus "first-pass" organs and those with a high degree of vascularization and blood flow (heart, lung, liver, spleen), exhibit significant gene expression. Due to the relatively large size of the NA/lipid complexes (>100 nm hydrodynamic diameter), expression is generally limited to the vascular endothelium except in organs that have discontinuous capillaries. For example, significant expression of transgenes has been observed in lung epithelium after i.v. administration [2, 29, 30]. Furthermore, the extracellular matrix is composed primarily of polyanionic elements such as heparin or chondroitin sulfate and therefore constitutes a barrier for cationic particles to reach target cells. In addition, pharmacological considerations such as plasma clearance and biodistribution are of great concern when injecting non-solute drugs such as Lx, underscoring the need for the optimization of their physico-chemical (charge and size) characteristics.

Generally, the less the charge and diameter are, the more particles remain in circulation in the blood stream making them available to interact with target cells. In light of this, careful design consideration of the formulation process made possible the successful *in vivo* use of Lx [31], which would otherwise be inactive following systemic administration. Lx, when formulated at low net charge ratio such as the DLS system [2], exhibit higher gene or ON transfer following intravenous injection in almost all organs tested except lung.

The universal applicability of the hypothesis of using cationic Lx to take advantage of interactions with the negative charges on the cell surface, such as the endothelial cells, appears restricted. Other types of cells, such as the hepatic parenchymal cells and those of the reticuloendothelial system demonstrate transfection efficiencies independent of surface charge [32]. In addition, the non-specific binding of positively charged particles to blood proteins greatly and rapidly neutralizes the net positive surface charge. Previous work has demonstrated the successful use of neutral or negatively charged liposomes to transfer the encapsulated pDNA following systemic injection in rodents [33, 34, 35]. These examples show that high pDNA compaction and cationicity are not absolute requirements for successful gene transfer. Lx particles of net cationic charge are efficient for lung targeting following i.v. delivery or for local administration such as intra-arterial administration, but exhibit serious drawbacks otherwise.

Following the low positively charged DLS formulation, we therefore developed a second generation vector system called Neutrplex generating, for the first time, negatively charged and stable Lx [3, 20]. Formation of anionic Nx was made possible by the insertion of cardiolipin (CL) in the lipid composition. CL is a negatively charged phospholipid with particular chemical and biological properties allowing first, the association (usually unstable) of lipids of opposite charge and second elaboration of a versatile formulation generating positive or negative charged stable Lx by only varying NA/lipid ratio [36]. Such Nx supramolecular assemblies are of spherical shape and exhibit a specific liquid crystal ultrastructure where DNA is circumferentially packaged between lipid bilayer [20]. CL does not specifically conduce to this specific ultrastructure as it was observed for DLS/DNA, but presence of CL in Nx might lead to a phase transition observed from lamellar to hexagonal phase [20, 36, 37]. CL is considered to prone hexagonal ultrastructure and to have fusogenic properties.

The main objective of this study is to delineate the cell uptake mechanisms used by Lx upon their global net charge and the consecutive effect on ON transfection activity. Toward this goal we prepared Lx of various charges and compared: (i) the physicochemical properties by zeta potential analysis and by dynamic light scattering, (ii) cell uptake by fluorescence microscopy and flow cytometry, and (iii) the biological activity of the transported ON by a positive readout cell culture experimental model. The direct evaluation of all those parameters at the same time was made possible for the first time through the use of the Neutrplex system.

Active transport was found as the major uptake mechanism for cationic particles, especially for DLS and Nx+ in optiMEM (62 and 66%, respectively for 3 and 6 h) in keeping with published data [5-8]. However, transport represented up to 62% for Nx- in serum-containing medium. Thus, Lx endocytosis represents an important cell entry pathway for anionic particles proportion, avoiding the negatively charged proteoglycans located onto plasma membrane, which have been described as cationic Lx cell mediator for uptake. DLS/ON Lx particles are more positively charged than Nx/ON (7.3 vs 2.0) and this seems to lead to a much higher contribution of active uptake compared to passive uptake (2-fold compared to 0.6-fold) with using DLS system (Fig. 6A and B). This might be observed with commercially available cationic lipid systems or otherwise developed systems exhibiting high global net charge ratio such as for Lipofectamine (Invitrogene) (13.5). It has to be noted that Lipofectamine does very poorly exhibit correction of splicing alteration [22, 23].

We showed that (i) it is possible to obtain homogenous and stable negatively charged Lx able to transfect cells, (ii) ON delivered within negatively charged Lx show high activity in serum-containing medium, (iii) highly positively charged Lx and optiMEM medium are the best conditions to obtain the highest activity in cell line. Overall, increasing negative charge in Lx led to a decrease in membrane binding and decrease in passive transport while increasing ON activity when solely serum is present in transfection medium. Increasing positive charge in Lx led to an increase of active transport while increasing ON activity solely in optiMEM transfection medium. Membrane binding of cationic or anionic Lx showed to increase with time in serum-containing medium whereas it appeared fast and saturable when using optiMEM.

The pharmacokinetics and bioavailability following i.v. administration in baboons of an ON delivered either in a free form, or using a cationic or the negatively charged DLS-derived Neutraplex carrier system were compared [3]. Whole body distributions and metabolism were compared using Positron Emission Tomography (PET) and an enzyme-based competitive hybridization assay. The anionic vector significantly improved the bioavailability and the pharmacokinetics profile. In addition, no toxicity was observed in treated baboons and consequently Nx appeared as a promising delivery system for *in vivo* administration of therapeutic ON.

Our results suggest that passive transport which might be of lipid fusion nature, is as well as endocytosis, a significant pathway by which Lx penetrate cell and release ON in the cytoplasm compartment. This mechanism seems be more efficient compared to active transport, first because it bypasses the vesicular endocytic traffic avoiding lysosome



hydrolytic enzymes, and second because of the overall seemingly higher ON release yield. Cell lines develop with consecutive cell culture passages, high endocytic activity; and their use, in combination with the use of Lx of high net global charge ratio certainly lead to the assumption that endocytosis is the unique significant uptake mechanism. It has to be noted that primary cells or hematopoietic cells such as peripheral blood mononuclear cells are difficult to transfect certainly due to their poor ability to elicit endocytosis. Several lipids (DOTAP, DOTMA, DOPE, CL) and polymer (PEG) facilitating Lx lipids fusion with the plasma membrane [1, 3, 38, 39, 40] or with the endosome membrane [41] have been described. Certainly, the specific highly ordered ultrastructure and the fusogenic ability of Lx used in this study [20] is an important factor for facilitating lipid exchange with either plasma or endocytic vesicle membranes and then free ON cytoplasm release. We believe that fusion mechanism must more closely be taken into consideration when developing Lx designed for *in vivo* or *ex vivo* nucleic acid transfer.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Cell line***

The HeLa pLuc/705 cell line was stably transfected with the pLuc/705 plasmid, in which the coding region of the luciferase sequence is interrupted by the mutated  $\beta$ -globin intron [21]. HeLa pLuc/705 cells were grown at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in minimal essential DMEM medium (Gibco, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% Na pyruvate, non essential amino-acids and a mix of penicillin, streptomycin and neomycin (100X, Gibco). Cells were checked routinely for the absence of mycoplasma contamination.

### ***Antisense oligonucleotides***

The 18-mer phosphodiester 2'-O-methyl-oligoribonucleotides (2'-O-Me) were purchased from Eurogentec SA (Seraing, Belgium). ON<sub>705</sub> (CCU CUU ACC UCA GUU ACA) is the antisense (AS) sequence, targeted to an aberrant splice site that is created in  $\beta$ -thalassemic patients by a T to G mutation at nucleotide 705 of intron 2 of human  $\beta$ -globin. ON<sub>SC</sub> (ACU ACC CGA UAU CUC CUC) is the scrambled (SC) version of ON<sub>705</sub>. For fluorescence microscopy and flow cytometry, 5'-FITC- or 5'-Alexa<sub>546</sub>-labelled 2'-O-Me were used.

### ***Lipoplex formulations***

The liposomes used for Lx (DLS and Nx) preparation consist of small unilamellar vesicles, able to complex to negatively charged ON. Neutraplex formulation was performed by mixing 1 mg DOGS, 1 mg DOPE or FITC-labelled DOPE (Sigma-Aldrich Chimie SARL, St Quentin Fallavier, France) and 0.5 mg cardiolipin (CL, Sigma) in 50  $\mu$ l ethanol and subsequently by adding excess pure water (6.25 mg lipid/ml, final) [20, 3]. Formation of lipoplex was carried out by mixing SUV (small unilamellar vesicles) suspension with ON, at several lipid/ON weight ratios. Cationic (Nx+) and anionic (Nx-) Lx were prepared, depending on the ON load charge in the formulation. DLS (Delivery Liposomal System) Lx were prepared with DOGS and DOPE only, as previously described [23, 42]. Lx were stored at 4°C and used within 3 months following preparation.

### ***Particle size distribution and zeta potential analysis***

Particle size and zeta potential were measured using a Malvern Zetasizer Nano ZS apparatus (Malvern Instruments, Orsay, France). All samples were kept at room temperature for 15 min prior to measurement and were analyzed undiluted. Samples analysis were carried out in automatic mode with the following parameters: scattering angle, 173°; temperature, 25°C; medium viscosity, 0.887 cP. Average diameters were evaluated as a Z-

average using a monomodal method (NNLS cumulant analysis). Zeta potential, measurements were carried out with the M3-PALS technology. Width at half peak height is indicative of the homogeneity of size and charge distribution.

### ***Transfections and reporter gene assays***

$3.5 \times 10^5$  cells/well were seeded in 6-well dishes with 10% FCS-containing medium. After overnight culture (16-20 h), cells were rinsed twice with PBS and the medium was replaced with DMEM medium-containing deplemented serum (Invitrogen). The Lx were then added to the cells and luciferase activity was monitored 24 h later. Following transfection, cells were rinsed twice with PBS and 300  $\mu$ l Reporter Lysis Buffer (Promega France, Charbonnières) was added. Protein concentration in the extracts was measured by the BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Pierce, Perbio Science France, Brebieres) at 560 nm. Firefly luciferase activity was measured using a Luciferase Assay Kit (Promega) and was quantified in the supernatant with a Berthold Centro LB 960 luminometer (Berthold France SA, Thoiry). Luciferase activity in cultured cells was expressed as relative light units (RLU) per  $\mu$ g of protein. Each data point was averaged over three replicates.

### ***RT-PCR analysis of splice correction***

After carrying out the luciferase and BCA<sup>TM</sup> Protein assays, the remaining part of the cell lysate (about 270  $\mu$ l) was transferred into 2 ml microfuge tubes and total RNA was extracted with 1 ml TRI Reagent (Sigma), according to the manufacturer's instructions. Thus, 0.3 ml of chloroform was used for extraction and the amount of isopropanol for RNA precipitation was increased to give a 1:1 mixture with the aqueous phase. The RNA was quantified by RT-PCR (MJ Research PTC200 Peltier Thermal cycler) with 5' TTG ATA TGT GGA TTT CGA GTC GTC 3' as forward primer and 5' TGT CAA TCA GAG TGC TTT TGG CG 3' as reverse primer, using the SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen). The products were analyzed on a 2% agarose gel and scanned using Gene Tools Analysis Software (SynGene, Cambridge, UK).

### ***Flow cytometry***

$5 \times 10^5$  cells/well were plated in 6-well dishes. After overnight culture, pLuc/705 HeLa cells were treated with Lx formulated with 5'-FITC-labelled 2'O-Me<sub>705</sub> in optiMEM or in deplemented serum-containing DMEM medium. Each experiment was performed in duplicate. After 1, 3 or 6 h incubation either at 37°C or at 4°C (by keeping cells on ice), cells were rinsed twice with cold PBS, centrifuged at 4°C, resuspended in 300  $\mu$ l cold PBS, in polystyrene tubes, and kept on ice until analysis. To strip-off the Lx bound at the cell surface, cells were treated with 1 ml glycine treatment (0.2 M, pH=2.8). For cell membrane fixation

evaluation, cells were subsequently treated with and without glycine. Cells were incubated at 37°C or 4°C for active or passive transport evaluation, respectively. Evaluation of ON binding onto plasma membrane was calculated by subtracting the fluorescence intensity of glycine treated cells from the fluorescence intensity of non treated cells. Evaluation of passive transport was calculated by subtracting the fluorescence intensity corresponding to ON membrane binding from the fluorescence intensity of cells incubated at 4°C. Evaluation of active transport was calculated by subtracting fluorescence intensity corresponding to ON membrane binding and that corresponding to the previously calculated for passive transport, from the fluorescence intensity non treated cells incubated at 37°C. Flow cytometry was performed with a FACS Canto (BD Biosciences France, Le Pont De Claix, France). Fluorescence intensity of 10,000 events was observed and recorded at 520 nm after excitation at 488 nm. Results were analyzed with WinMDI software. Each data point was averaged over two replicates.

#### ***Live cell observation by fluorescence microscopy***

5 x 10<sup>5</sup> cells/well were plated in 35 mm single wells. Following overnight culture, pLuc/705 HeLa cells were treated with Lx formulated with 5'-FITC- or with 5'-Alexa<sub>546</sub>-labelled 2'-O-Me<sub>705</sub> (Eurogentec), in 10% FCS-containing medium. For studying of lipoplex transport pathways, FITC-labelled lipid DOPE was included in the formulation (Sigma). Cells were rinsed twice with PBS. Living cells were directly observed in the dishes, in 1 ml of 10% FCS-containing medium, after 1 to 24 h of transfection. Fluorescence distribution was analyzed on a Zeiss Axiovert 200M fluorescence microscope without fixation (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), with a 63x objective. Images were first acquired with AxioVision software. After exportation, images were analyzed with Adobe Photoshop and ImageJ softwares.

#### ***Cytotoxicity assay***

Cell viability and cytotoxicity studies were performed by plating pLuc/705 HeLa cells into 96-well plates at 3 x 10<sup>4</sup> cells/well. Cells were incubated with Lx for 24 h in optiMEM or in serum-containing deplete DMEM medium. The proportion of live cells was determined by the tetrazolium-based colorimetric cell proliferation assay (MTS, Promega) by reading the absorbance at 560 nm. Data are expressed as the percentage of cytotoxicity (relative to untreated cells).

## **AKNOWLEDGMENTS**

We thank Ryszard Kole (University of North Carolina, Chapel Hill, USA) for providing pLuc/705 cell line. Studies funded by EEC grant QLK3-CT-2002-01989 and CEFIPRA grant 3205. Sarah Resina had a pre-doctoral fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

## REFERENCES

1. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz Met *al.* (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **84**: 7413-7.
2. Thierry AR, Lunardi-Iskandar Y, Bryant JL, Rabinovich P, Gallo RC and Mahan LC (1995). Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **92**: 9742-6.
3. Tavitian B, Marzabal S, Boutet V, Kuhnast B, Terrazzino S, Moynier Met *al.* (2002). Characterization of a synthetic anionic vector for oligonucleotide delivery using in vivo whole body dynamic imaging. *Pharm Res*; **19**: 367-76.
4. Tranchant I, Thompson B, Nicolazzi C, Mignet N and Scherman D (2004). Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids. *J Gene Med*; **6 Suppl 1**: S24-35.
5. Shi J, Yan WW, Qi XR, Yang L and Zhang L (2004). [Biodistribution and hepatocytes targeting of cationic liposomes surface-modified with sterylglucoside and golyethylene glycol]. *Yao Xue Xue Bao*; **39**: 551-5.
6. Harashima H, Shinohara Y and Kiwada H (2001). Intracellular control of gene trafficking using liposomes as drug carriers. *Eur J Pharm Sci*; **13**: 85-9.
7. Zelphati O and Szoka FC, Jr. (1996). Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **93**: 11493-8.
8. Zuhorn IS, Kalicharan R and Hoekstra D (2002). Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *J Biol Chem*; **277**: 18021-8.
9. Kirkham M and Parton RG (2005). Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta*; **1745**: 273-86.
10. Ulrich AS (2002). Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep*; **22**: 129-50.
11. Khalil IA, Kogure K, Futaki S and Harashima H (2006). High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression. *J Biol Chem*; **281**: 3544-51.
12. Nichols B (2003). Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci*; **116**: 4707-14.
13. Wasungu L and Hoekstra D (2006). Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release*; **116**: 255-64.
14. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS and Hoekstra D (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*; **377**: 159-69.
15. Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC and Wakeham DE (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*; **17**: 517-68.

16. Templeton NS (2002). Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo. *Biosci Rep*; **22**: 283-95.
17. Duzgune, scedil and Nir S (1999). Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions. *Adv Drug Deliv Rev*; **40**: 3-18.
18. Thierry AR and Dritschilo A (1992). Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity. *Nucleic Acids Res*; **20**: 5691-8.
19. Thierry AR, Rabinovich P, Peng B, Mahan LC, Bryant JL and Gallo RC (1997). Characterization of liposome-mediated gene delivery: expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA. *Gene Ther*; **4**: 226-37.
20. Schmutz M, Durand D, Debin A, Palvadeau Y, Etienne A and Thierry AR (1999). DNA packing in stable lipid complexes designed for gene transfer imitates DNA compaction in bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **96**: 12293-8.
21. Kang SH, Cho MJ and Kole R (1998). Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry*; **37**: 6235-9.
22. Thierry AR, Abes S, Resina S, Travo A, Richard JP, Prevot P *et al.* (2006). Comparison of basic peptides- and lipid-based strategies for the delivery of splice correcting oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*; **1758**: 364-74.
23. Resina S, Kole R, Travo A, Lebleu B and Thierry AR (2007). Switching on transgene expression by correcting aberrant splicing using multi-targeting steric-blocking oligonucleotides. *J Gene Med*; **9**: 498-510.
24. Lavigne C, Lunardi-Iskandar Y, Lebleu B and Thierry AR (2004). Cationic liposomes/lipids for oligonucleotide delivery: application to the inhibition of tumorigenicity of Kaposi's sarcoma by vascular endothelial growth factor antisense oligodeoxynucleotides. *Methods Enzymol*; **387**: 189-210.
25. Thierry AR, Rahman A and Dritschilo A (1993). Overcoming multidrug resistance in human tumor cells using free and liposomally encapsulated antisense oligodeoxynucleotides. *Biochem Biophys Res Commun*; **190**: 952-60.
26. Abes S, Williams D, Prevot P, Thierry A, Gait MJ and Lebleu B (2006). Endosome trapping limits the efficiency of splicing correction by PNA-oligolysine conjugates. *J Control Release*; **110**: 595-604.
27. Loke SL, Stein CA, Zhang XH, Mori K, Nakanishi M, Subasinghe C *et al.* (1989). Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **86**: 3474-8.
28. Plank C, Mechtler K, Szoka FC, 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**: 1437-46.
29. Zhu N, Liggitt D, Liu Y and Debs R (1993). Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science*; **261**: 209-11.

30. Li S and Huang L (1997). In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther*, **4**: 891-900.
31. Hofland HE, Shephard L and Sullivan SM (1996). Formation of stable cationic lipid/DNA complexes for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **93**: 7305-9.
32. Gregoriadis G, Saffie R and Hart SL (1996). High yield incorporation of plasmid DNA within liposomes: effect on DNA integrity and transfection efficiency. *J Drug Target*, **3**: 469-75.
33. Soriano P, Dijkstra J, Legrand A, Spanjer H, Londos-Gagliardi D, Roerdink Fet al. (1983). Targeted and nontargeted liposomes for in vivo transfer to rat liver cells of a plasmid containing the preproinsulin I gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **80**: 7128-31.
34. Baru M, Axelrod JH and Nur I (1995). Liposome-encapsulated DNA-mediated gene transfer and synthesis of human factor IX in mice. *Gene*; **161**: 143-50.
35. Alino SF, Bobadilla M, Crespo J and Lejarreta M (1996). Human alpha 1-antitrypsin gene transfer to in vivo mouse hepatocytes. *Hum Gene Ther*; **7**: 531-6.
36. Thierry AR, Rastogi A, Lavigne C, Schmutz M, Durand D, Palvadeau Y and Lebleu B (in preparation). Supramolecular auto-organization of DNA and cationic lipid with cardiolipin in anionic particles of high gene transfer capacities.
37. Thierry AR, Durand D., Schmutz M., and Lebleu B. (2006). DNA supramolecular self assemblies as a biomimetic complex system. *Emergent Properties in Natural and Artificial Dynamical Systems*, Aziz-Alaoui and Bertelle (Eds), Springer, 103-118.
38. de Lima MC, Simoes S, Pires P, Gaspar R, Slepushkin V and Duzgunes N (1999). Gene delivery mediated by cationic liposomes: from biophysical aspects to enhancement of transfection. *Mol Membr Biol*; **16**: 103-9.
39. Pires P, Simoes S, Nir S, Gaspar R, Duzgunes N and Pedroso de Lima MC (1999). Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *Biochim Biophys Acta*; **1418**: 71-84.
40. Goryacheva YA, Vekshina OM, Yashin VA and Kim YA (2005). Fusion and endocytosis of anionic liposomes with Ehrlich ascitic carcinoma cells. *Bull Exp Biol Med*; **140**: 733-5.
41. Zhang Y, Rong Qi X, Gao Y, Wei L, Maitani Y and Nagai T (2007). Mechanisms of co-modified liver-targeting liposomes as gene delivery carriers based on cellular uptake and antigens inhibition effect. *J Control Release*; **117**: 281-90.
42. Lavigne C and Thierry AR (1997). Enhanced antisense inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in cell cultures by DLS delivery system. *Biochem Biophys Res Commun*; **237**: 566-71.



**TABLE**

**Table 1.** Physico-chemical characterization of the liposomes and lipoplexes used in this study. Particles mean diameter was measured by dynamic light scattering and the surface charge by zeta potential. N.D., non determined. Nx+, cationic Nx lipoplexes. Nx-, anionic Nx lipoplexes. Nx20 or 40, 20 or 40  $\mu\text{g}$  ON mixed with 156  $\mu\text{g}$  total lipids.

TYPE OF FORMULATION		ON	MEAN SIZE (nm)	$\zeta$ POTENTIAL (mV)
LIPOSOME	DLS		137	N.D.
	Nx		170	N.D.
LIPOPLEX	DLS	2'O-Me	179	+ 44
	Nx+ 20	2'O-Me	278	+ 22
	Nx- 40	2'O-Me	203	- 37

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Cytotoxicity in HeLa pLuc/705 cells by increasing concentrations of 2'O-Me<sub>705</sub> delivered with DLS (A), with Nx+ 20 (B) or with Nx- 40 formulation (C), for 24 h, in serum-containing medium (white bars) or in optiMEM (black bars). ON concentrations complexed with the liposomes are indicated. The level of cytotoxicity was determined by the tetrazolium-based colorimetric cell proliferation assay and expressed as percent of the cytotoxicity level in treated cells reported to that in non-treated cells. Cells incubated with 1% X-100 Triton correspond to positive control. Error bars show standard deviation (n=3).

**Figure 2.** Epifluorescence image of unfixed HeLa pLuc/705 cells incubated with 250 nM FITC-labelled 2'O-Me<sub>705</sub> delivered with the Nx+ 20 system. Living cells were directly observed under green epifluorescence in PBS supplemented with 5% FCS, following 5h incubation at 37°C.

**Figure 3.** Illustration of the evaluation of the contribution of active or passive transport. FACS analysis data of Nx+ (A, B, C) or Nx- (D) treated cells are shown. Cells were incubated with 100 nM of 5'-FITC-labelled 2'O-Me<sub>705</sub> delivered with the Nx+ 20 or Nx- 40 lipoplexes in live HeLa cells. Following 1 h incubation in optiMEM, at 4 or 37°C, HeLa pLuc/705 cells were rinsed with PBS and treated or not with glycine. Evaluation of ON binding onto cells was calculated by subtracting fluorescence intensity of glycine treated cells from non treated cells. Evaluation of passive transport was calculated by subtracting fluorescence intensity corresponding to ON fixation from fluorescence intensity of 4°C incubated cells. Evaluation of active transport was calculated by subtracting fluorescence intensity corresponding to ON fixation and to 4°C incubated cells. NT, non treated cells. Two samples were treated for each condition.

**Figure 4.** Evaluation of the proportions (%) of active transport, passive transport and cell surface binding of 5'-FITC-labelled 2'O-Me<sub>705</sub> delivered with the DLS, Nx+ 20 or Nx- 40 lipoplexes in live HeLa cells. Following 3 h (A) or 1, 3 and 6 h (B) incubation in serum-containing culture medium or in optiMEM, at 4 or 37°C, HeLa pLuc/705 cells were rinsed with PBS and treated or not with glycine. Evaluation of ON fixation onto cells was calculated by subtracting fluorescence intensity of glycine treated cells from non treated cells. Evaluation of passive transport was calculated by subtracting fluorescence intensity corresponding to ON fixation from fluorescence intensity of 4°C incubated cells. Evaluation of active transport was calculated by subtracting fluorescence intensity corresponding to ON fixation and to

4°C incubated cells. Then, cells were subjected to flow cytometric analysis. Two samples were treated for each condition.

**Figure 5.** Epifluorescence images of unfixed HeLa pLuc/705 cells incubated with 250 nM Alexa<sub>546</sub>-labelled 2'O-Me<sub>705</sub> (red fluorescence) delivered with the Nx- 40 system containing FITC-labelled lipids (green fluorescence). Living cells were directly observed in PBS supplemented with 5% FCS, after 1h incubation at 37°C. (A), (B) and (C) are images of the same field of microscopical observation. Images of cells were observed under green (A) or red (B) epifluorescence and under superposition of green and red epifluorescence (C).

**Figure 6.** (A) Splicing correction with DLS-formulated ON. 100 nM 2'O-Me<sub>705</sub> (DLS-AS) or 2'O-Me<sub>SC</sub> (DLS-SC) delivered with DLS were incubated for 24h with HeLa pLuc/705 cells, in presence or absence of serum-containing medium. The values of treated cells were subtracted from NT (non treated) value (=2715 RLU/μg for DMEM and 2126 for optiMEM). (B, C) Optimization of the Neutraplex formulation for splicing correction. 100 nM 2'O-Me<sub>705</sub> / Nx were prepared with varying ON/lipid ratios and incubated 24h with HeLa pLuc/705 cells in serum-containing medium (B) or in optiMEM (C). Nx 10/20, 10/20 μg ON mixed with 156 μg total lipids. The values of treated cells were subtracted from NT (non treated) value (=2031 RLU/μg for DMEM and 1434 for optiMEM). Error bars show standard deviation (n=3).

**Figure 7.** RT-PCR analysis of splice correction. HeLa pLuc/705 cells were incubated for 24 h in serum containing-medium (A) or optiMEM (B), in the absence (NT) or in the presence of 100 nM 2'O-Me ON<sub>705</sub> delivered with the DLS or the Nx system. Total RNA was extracted and amplified by RT-PCR. PCR products from incorrectly (268 bp) and correctly (142 bp) spliced luciferase pre-mRNA were analyzed on a 2% agarose gel. Nx15 or 25, 15 or 25 μg ON mixed with 156 μg total lipids.

**ADDITIVE RESULT.** Epifluorescence images of unfixed HeLa pLuc/705 cells incubated with 250 nM Alexa<sub>546</sub>-labelled 2'O-Me<sub>705</sub> delivered with the Nx- 40 system containing FITC-labelled lipids (green fluorescence). Living cells were directly observed in PBS supplemented with 5% FCS, after 1h incubation at 37°C. (A), (B) and (C) are images observed under green epifluorescence.

FIGURE 1

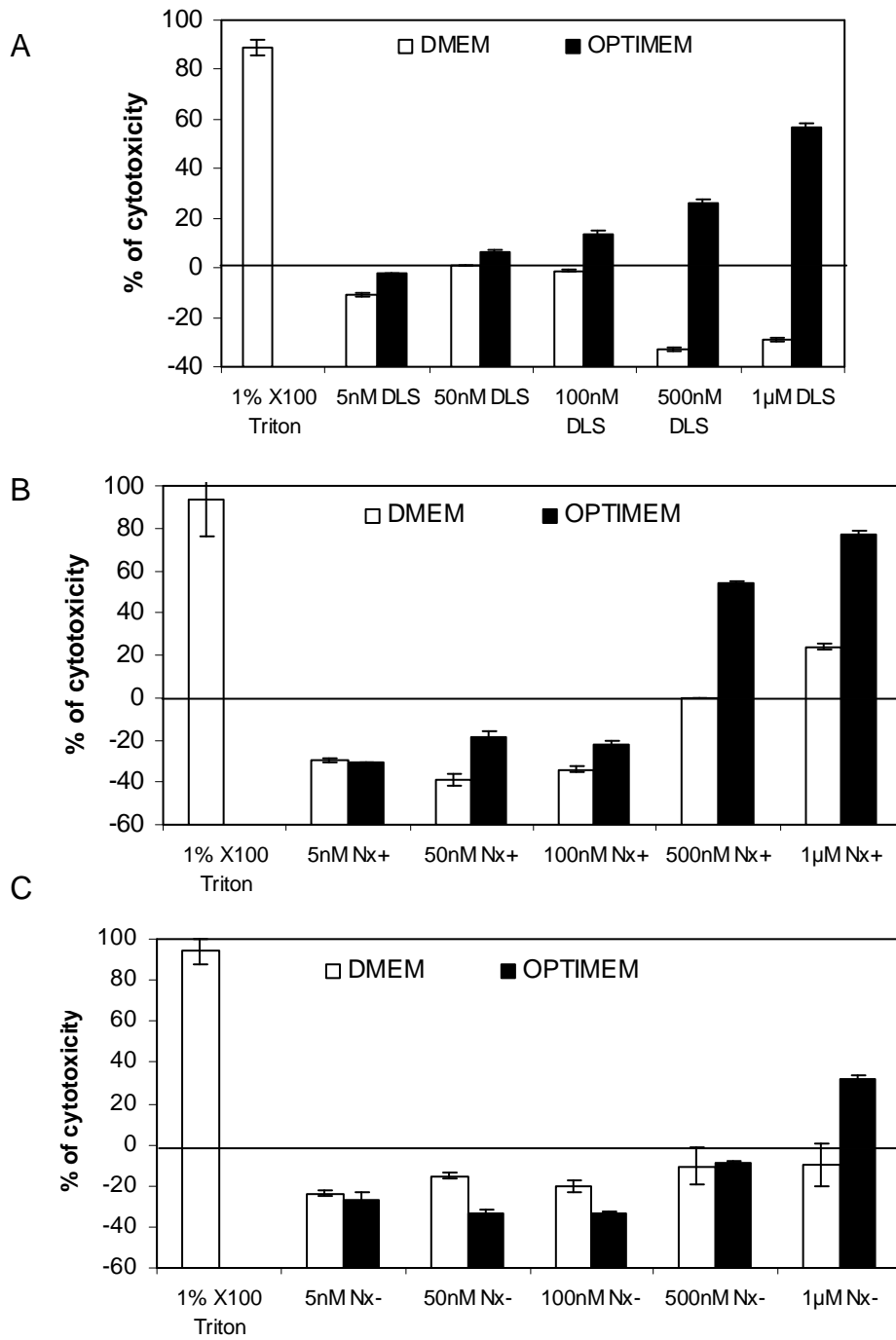


FIGURE 2

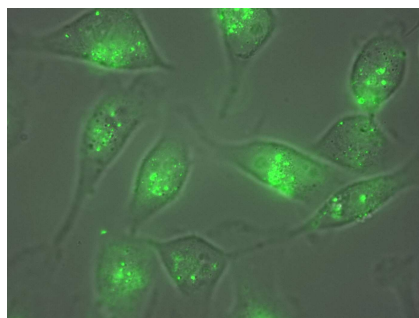


FIGURE 3

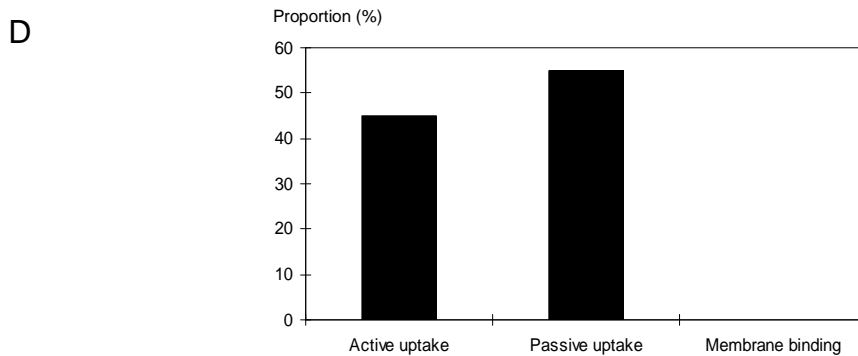
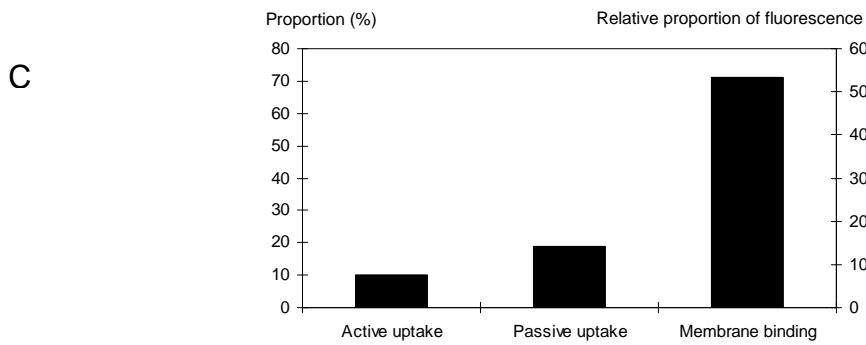
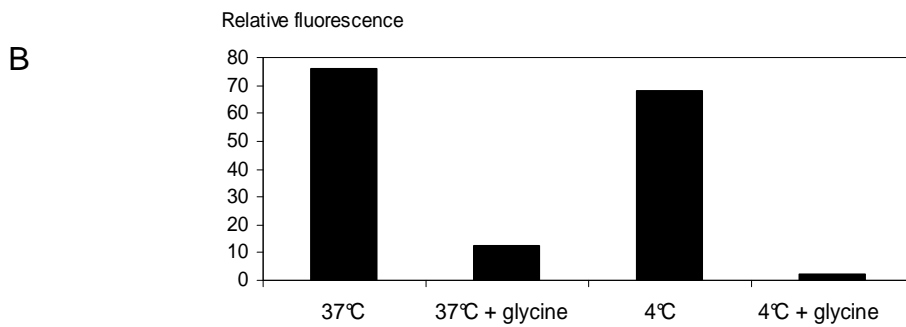
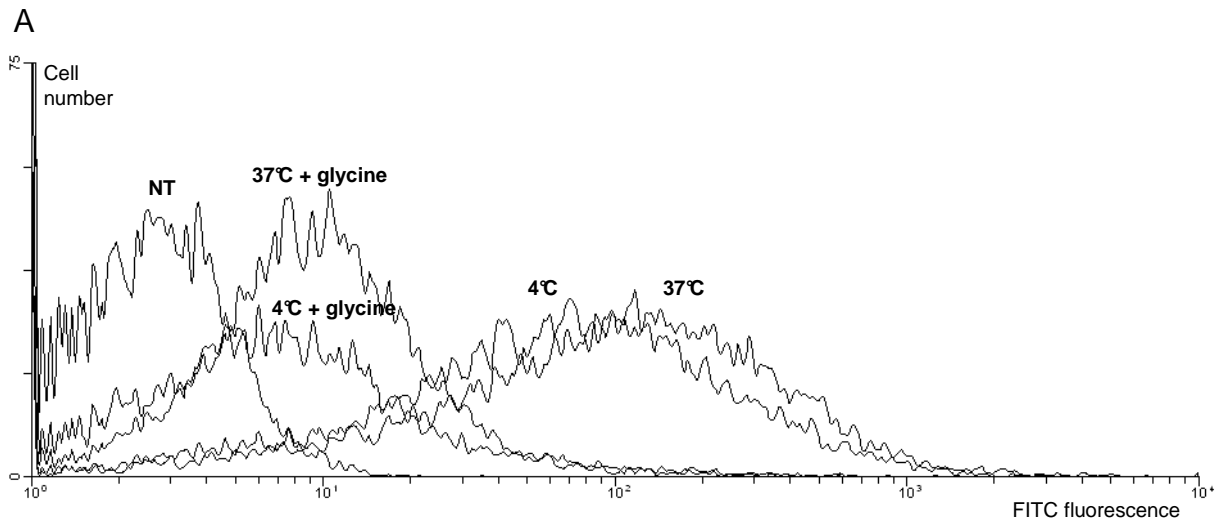


FIGURE 4

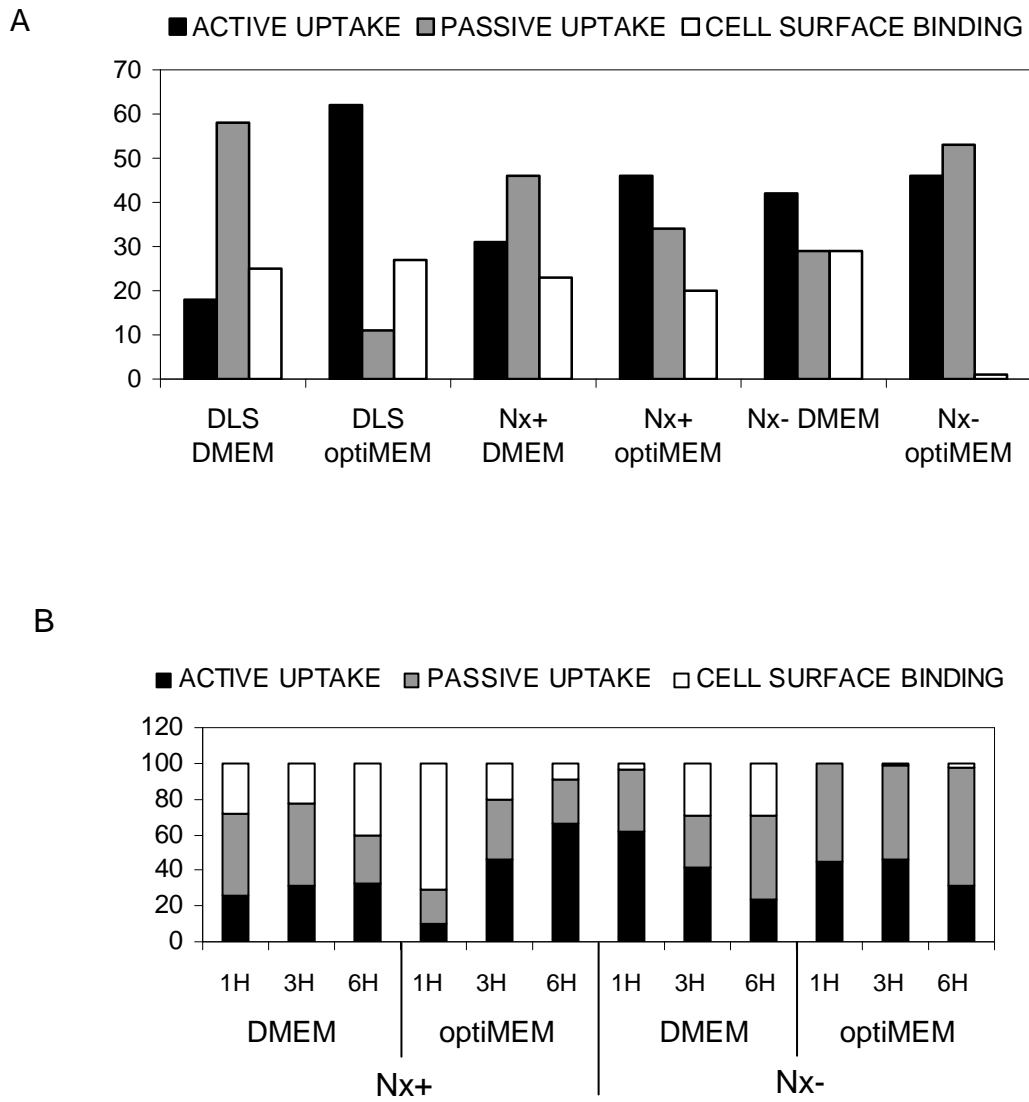


FIGURE 5

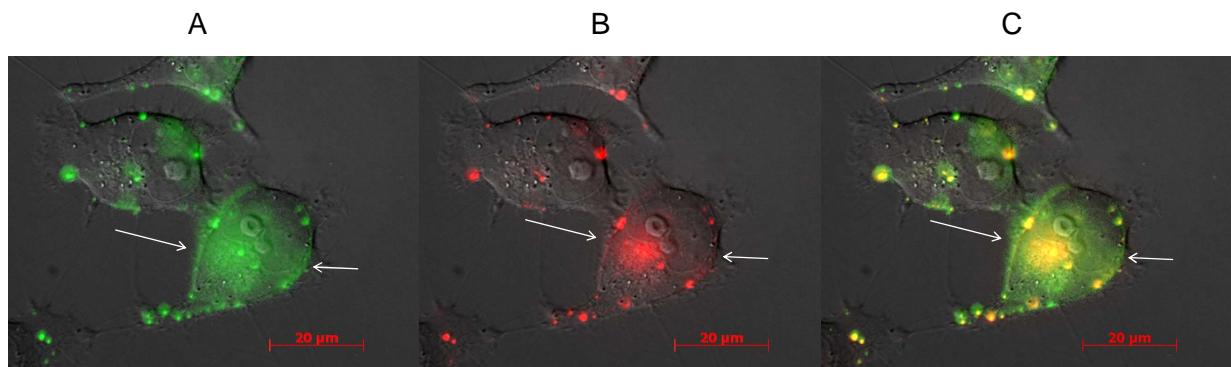
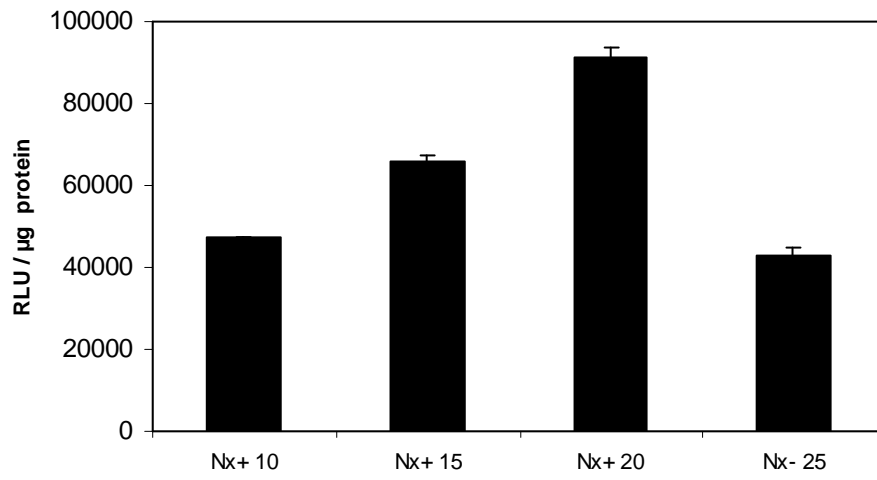


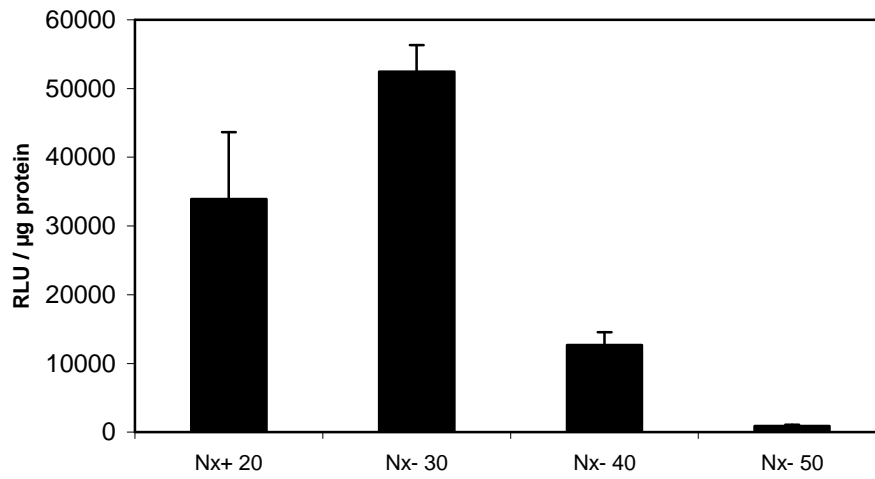


FIGURE 6

A



B



C

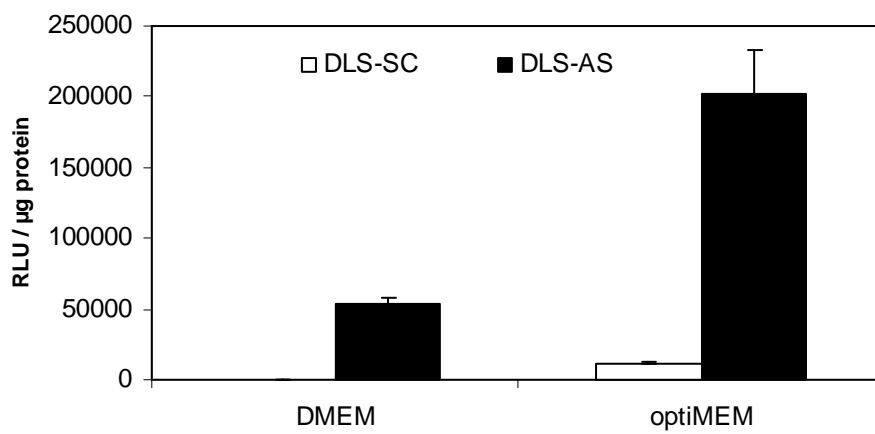
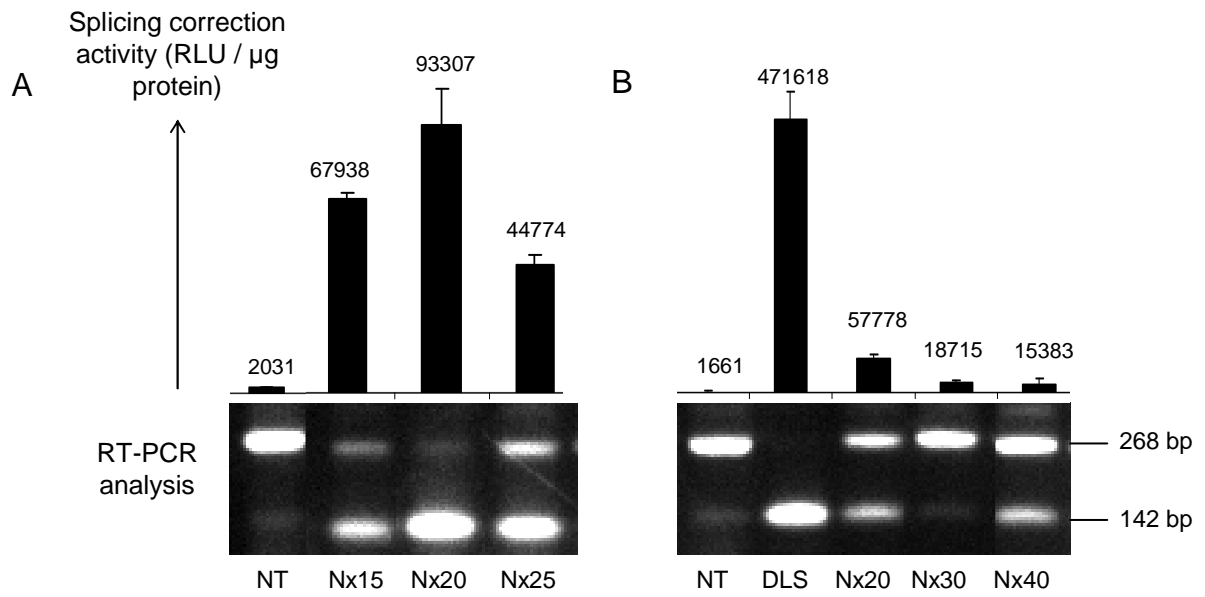
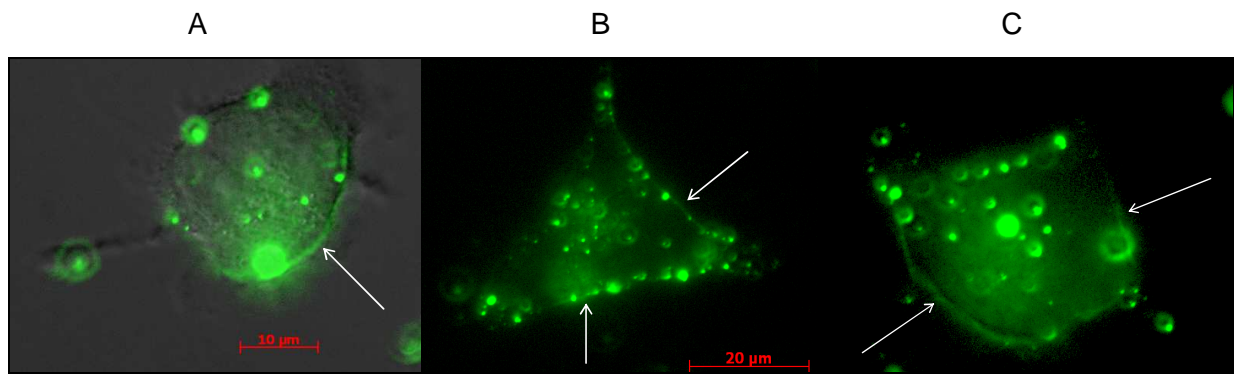


FIGURE 7



ADDITIVE RESULT



**CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET  
PERSPECTIVES**

L'association intermoléculaire entre des lipides, présentés par des liposomes, avec des ON, conduit à former un complexe, dans lequel les lipides constituent le transporteur et l'ON le principe actif à protéger et à véhiculer dans la cellule. Ce complexe est une entité à part entière : une particule globalement chargée mélangeant intimement les 2 types de constituants au sein d'une même entité, pouvant être hautement structurés, le principe actif faisant partie intégrante de cette structure. La conception et l'optimisation de telles formulations deviennent donc importants pour permettre la délivrance d'ON médicaments dans le cytoplasme (stratégie interférence) ou dans le noyau (stratégie antisens) des cellules.

Plusieurs phénomènes importants interviennent dans la formation des lipoplexes :

1. l'équilibre thermodynamique,
2. la réaction de neutralisation de charges des polyélectrolytes (théorie de condensation des contre-ions de Manning-Oosawa),
3. l'auto-assemblage
4. l'ultrastructure.

Les complexes formés se caractérisent principalement par leur ultrastructure et leurs propriétés physico-chimiques. L'ultrastructure est issue d'un phénomène d'auto-assemblage hautement lié à la thermodynamique, conduisant à des entités stables, puisqu'il s'arrête à un moment donné. Nous pensons que nous sommes en présence d'un système dit « complexe » (Thierry *et al.* 2007). Ce phénomène permet :

- une plus grande homogénéité car les particules ont la même taille,
- une plus grande reproductibilité,
- un meilleur déroulement dans les endosomes.

De ce point de vue, l'ultrastructure pourrait être à l'origine de la fusion des lipoplexes avec les lipides de la membrane plasmique et avec ceux des endosomes, facilitant ainsi l'entrée des lipoplexes dans la cellule par fusion et leur sortie des endosomes. Elle paraît donc déterminante pour l'efficacité et la stabilité des particules.

## **I. FORMULATIONS.**

Dans les expériences de correction de l'épissage et l'internalisation des ON, 2 types de liposomes ont été testés, complexés aux ON : les DLS (cationiques) et les Nx, dérivés des DLS (cationiques et anioniques). Pour pouvoir corrélérer l'efficacité de correction de l'épissage alternatif anormal ou l'internalisation des particules avec la « qualité » de la formulation, les

liposomes ainsi que les lipoplexes ont été caractérisés par mesure de leur taille (par Dynamic Light Scattering) et / ou par mesure du potentiel  $\zeta$  (voir Tableau 12).

Il est important de noter que 2 étapes sont nécessaires à la formation des Lx : d'abord, la préparation des liposomes ; ensuite, le mélange ON / liposomes. Les particules DLS et Nx correspondent à des mélanges homogènes, présentant une dispersion monomodale en mesure de taille et sans la présence d'agrégats, même au bout de plusieurs semaines. Ces formulations de liposomes et de lipoplexes sont donc stables au cours du temps, ce qui présente un énorme avantage pour le développement pharmaceutique de telles formulations en tant que médicaments (Tavitian *et al.* 2002).

**Tableau 12 : propriétés biophysiques des formulations de liposomes ou de lipoplexes, réalisées à partir de DLS et de Nx. N.D. : non déterminé.**

*Nx20 / 40 : formulations de Nx réalisées avec 20 / 40 $\mu$ g d'ON par dose.*

LIPOSOMES	ON	TAILLE MOYENNE (nm)	POTENTIEL $\zeta$ (mV)	REFERENCE
DLS		137	N.D.	Resina <i>et al.</i> 2007a
DLS	siRNA	248	N.D.	Meryet-Figuières <i>et al.</i> 2007
DLS	2'O-Me	160 179	+ 43.5	Resina <i>et al.</i> 2007a et en préparation
DLS	MOE	178 208	N.D.	Données non publiées
Nx		170 186	N.D.	Resina <i>et al.</i> en préparation
Nx+ 20	2'O-Me	278	+ 21.8	Resina <i>et al.</i> en préparation
Nx- 40	2'O-Me	203	- 37.2	Resina <i>et al.</i> en préparation

Les liposomes, DLS et Nx, sont des particules < 200nm ; les données de la littérature étant souvent en contradiction, nous avons convenu que ces liposomes entraient dans la classe des SUV. Les liposomes Nx ont une taille plus élevée que les liposomes DLS. Les complexes formés avec les ON sont des particules plus grosses. Les complexes DLS formés à partir de siRNA (Meryet-Figuières *et al.* 2007) ont globalement une taille plus importante que ceux

formés à partir de 2'O-Me ou de MOE, probablement à cause de leur structure en double-brin. De même, les complexes contenant les MOE-ON ont une taille légèrement plus élevée que ceux contenant les 2'O-Me-ON, pour la même quantité d'ON par dose de liposomes : la différence pourrait s'expliquer par le fait que les 2'O-Me sont des ON ARN, les MOE sont des ON ADN. Globalement, la taille ainsi que la polydispersité obtenues pour les diverses formulations sont compatibles avec une administration *in vivo*.

Comme décrit auparavant, les complexes DLS sont globalement très cationiques, ce qui constitue la limitation de leur utilisation systémique *in vivo*. En effet, ces particules se lient rapidement avec les protéines, chargées négativement, telles les protéines circulantes et les protéines sériques comme l'albumine, ce qui conduit à leur inactivation et aussi à une toxicité accrue. Le rapport de charge entre les lipoplexes testés et les ON non marqués, est de 1.0 et 2.0 pour les Nx- et Nx+ respectivement, de 7.3 pour les DLS et de 13.5 pour la LFA, vraisemblablement la plus toxique *in vitro*.

Les Nx ont été les 1<sup>ers</sup> lipoplexes décrits de charge globale nette négative, stables et efficaces pour la transfection d'AN. Ils possèdent la même ultrastructure spécifique hautement ordonnée que les DLS et permettent d'obtenir des complexes cationiques (Nx+) et anioniques (Nx-) selon la quantité d'AN complexés aux liposomes. Thermo-dynamiquement, il était jusqu'à lors impossible de réaliser des complexes négatifs stables. La cardiolipine est un lipide négatif ajouté dans la formulation ; normalement, il est impossible d'obtenir des particules stables formées d'un mélange de lipides cationiques et anioniques. De plus, la CL est un lipide fusogénique comme le DOPE, ce qui crée une déstabilisation potentielle du liposome, qui devient extrêmement réactif à l'auto-organisation. La formation de lipoplexes est alors réalisable et permet même la production de lipoplexes chargés négativement. Des Nx- formés uniquement avec du DOGS et de la CL se sont avérées très efficaces pour le transfert de gène. Ceci suggère que le caractère fusogénique, conduisant à la formation de structures hexagonales, est essentiel pour l'efficacité des Lx. Il semble qu'il faille concevoir des particules Lx possédant à la fois, ou prônant la transition de phase d'une structure lamellaire, pour la stabilité de la particule, à une structure hexagonale, pour la possibilité de fusion avec les membranes cellulaires, pour un meilleur relargage de l'AN dans le cytoplasme (Thierry *et al.* en préparation).

Autour du point de neutralité, les complexes Nx sont soit moins cationiques, soit anioniques. Le caractère anionique des complexes Nx est à l'origine d'une diminution de la cytotoxicité des liposomes *in vitro*, en comparaison avec les DLS (Resina *et al.* en préparation). Les complexes Nx offrent aussi l'avantage d'amoindrir les barrières pharmacologiques et physiologiques, et d'améliorer notamment le transport dans la matrice cellulaire des tissus, voire l'extravasation (Tavitian *et al.* 2002).

Dans le laboratoire, nous avons tenté de faire le lien entre la taille des complexes et l'efficacité de transfection. En effet, dans la mise au point des formulations, nous avons pu obtenir des complexes de très petite taille, de l'ordre de 40 à 70nm, avec une dispersion monomodale. En parallèle, ces complexes corrigeaient très peu l'épissage en présence de sérum. De plus, les expériences de microscopie nous ont montré que les particules pénétraient très peu dans la cellule dans ces cas-là, même au bout de 24h de transfection (données non publiées). Notre hypothèse a été que les petites particules sont plus rapidement inhibées par la liaison aux protéines sériques, ce qui n'a pas été le cas pour les complexes de 160 à 250nm qui se sont avérées efficaces *in vitro*.

## II. PENETRATION DES LIPOPLEXES.

Les expériences de microscopie et de cytométrie en flux (FACS) avec des ON marqués (FITC, Alexa<sub>546</sub>) nous ont permis d'observer la pénétration des lipoplexes dans les cellules, ainsi que le devenir des ON au cours du temps, *in vitro* dans les cellules non fixées. D'une façon générale, les lipoplexes pénètrent rapidement dans les cellules, dans un milieu en présence ou en absence de sérum. Au bout de 1h de transfection, par microscopie à fluorescence, on observe déjà un marquage ponctué dans le cytoplasme, et les ON se retrouvent dans le noyau des cellules à partir de 4h de transfection, avec une localisation diffuse (Resina *et al.* 2007b). Les lipoplexes n'apparaissent donc pas séquestrés dans les vésicules d'endocytose, comme les endosomes, évitant d'être dégradés ensuite par les enzymes lysosomolytiques.

Il est généralement bien admis que les lipoplexes entrent par endocytose dans les cellules, malgré quelques timides tentatives pour impliquer un phénomène de transport passif, la fusion. Les molécules testées étant toujours cationiques, nous nous sommes proposés d'étudier le type de pénétration empruntée par les lipoplexes selon leur charge, le transport actif étant inhibé à 4°C. Nous aurions pu utiliser des marqueurs « classiques » et spécifiques



de l'endocytose moyenne et tardive. La fusion n'offre pas de marquage possible et nous voulions comparer les 2 types de transport actif et passif, donc seules les techniques de cytométrie en flux et de microscopie à épifluorescence nous ont semblé adaptées pour réaliser ces expériences.

La mise au point d'un protocole de transfection des cellules à 4 ou 37°C, avec traitement ou non des cellules à la glycine, nous a permis de discriminer 3 processus principaux (Resina *et al.* en préparation) :

1. la fixation des complexes à la membrane
2. un mécanisme actif de pénétration, type endocytose
3. un mécanisme passif de pénétration, type fusion des lipides.

Ainsi, ces 3 mécanismes paraissent dépendre du temps de transfection, du type de formulation c'est-à-dire de la charge des complexes, ainsi que du milieu de transfection utilisé.

Nos résultats solides de FACS ainsi que les images de microscopie à épifluorescence montrant un marquage lipidique au niveau membranaire, sont selon nous la confirmation de notre hypothèse : les vecteurs à base de lipides cationiques utilisent aussi une voie de transport passif pour pénétrer dans les cellules, non énergie-dépendante.

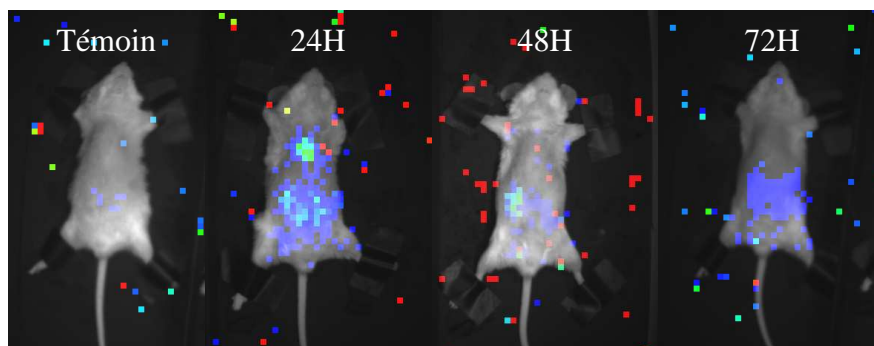
Les Lx DLS et Nx empruntent donc à la fois un transport actif et un transport passif de pénétration. Les résultats suggèrent que les complexes anioniques empruntent plus la voie passive de pénétration que les complexes cationiques. En effet, l'endocytose, transport actif, peut être médiée par les héparanes sulfates des protéoglycans de la membrane cellulaire, chargés négativement. Les particules chargées négativement sont limitées au niveau de leurs interactions avec ces composants membranaires. La charge des complexes en surface est donc un facteur influençant la pénétration des particules.

Un autre facteur pouvant influencer la pénétration des lipoplexes dans les cellules est la saturation des récepteurs cellulaires en surface. En effet, des expériences de FACS ont montré un plateau de fluorescence à partir d'une certaine concentration d'ON complexés aux liposomes, et ce pour 4 à 6h de transfection (Resina *et al.* 2007a et données non publiées). Ainsi, à partir d'une certaine concentration, les lipoplexes paraissent ne plus pouvoir pénétrer dans la cellule, ou très peu. Cette concentration est aussi dépendante du milieu de transfection. Les sites à la surface de la membrane plasmique deviennent tous occupés ce qui limite

l'internalisation dans la cellule des autres lipoplexes encore libres dans le milieu : c'est un phénomène de pseudo « saturation ».

*In vivo*, des résultats préliminaires avaient été assez encourageants (données non publiées), en collaboration avec l'équipe du Dr. Patrick Midoux (Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans). Des souris Balb<sup>C</sup>/By mâles âgées de 6 semaines ont été injectées i.v. dans la veine de la queue avec 170µl de complexes DLS-pTG11033 (plasmide exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous la dépendance du promoteur CMV), soit 44µg d'ADN par animal (voir Figure 35).

**Figure 35** : distribution de la luciférase après injection de DLS-pTG11033, en fonction du temps. Témoin : souris injectée avec du sérum physiologique.



A 24h après l'injection, on observe très distinctement la luciférase au niveau des poumons et du cœur, ainsi qu'au niveau de l'abdomen (foie, rate) de l'animal. A 48h, la souris présente encore un peu de bioluminescence au niveau de l'abdomen. Une faible activité réside dans l'abdomen 72h après administration.

### **III. CORRECTION DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF ET MODULATION DE L'EXPRESSION DU TRANSGÈNE.**

*In vitro*, notre équipe a pu corriger l'épissage alternatif anormal sur le modèle de cellules HeLa pLuc705, à la fois grâce aux liposomes DLS et Nx, ainsi qu'avec certains peptides comme (R-Ahx-R)<sub>4</sub> et R<sub>6</sub>-Pen, sans l'addition d'agents endosomolytiques. Ce modèle est à ce jour utilisé en routine et nous sert à évaluer l'efficacité de délivrance des vecteurs testés, y compris ceux développés par nos collaborateurs. D'après notre collaborateur Ryszard Kole (Université de Caroline du nord, Chapel Hill, Etats-Unis), ce modèle serait le plus « simple » à corriger, puisqu'il présente peu de bruit de fond. En effet, il existe des modèles développés *in vitro* et *in vivo* (souris KO) plus proches de la  $\beta$ -thalassémie :  $\beta$ -

globine et EGFP, dont la mutation se trouve en position 654 de l'intron 2. Cependant, le modèle de cellules HeLa pEGFP<sub>654</sub> présente beaucoup de bruit de fond, ce qui limite son utilisation en microscopie et en cytométrie en flux (Sazani *et al.* 2002). Nos quelques expériences de microscopie et de FACS sur ce modèle n'ont rien démontré, la quantité de fluorescence verte paraissant trop faible en cas de correction, en comparaison avec le bruit de fond, même en utilisant la LFA<sub>2000</sub> comme vecteur des ON dans les meilleures conditions d'incubation (données non publiées) ; ces travaux n'ont pas été poursuivis en RT-PCR. Le modèle de souris KO déficientes pour la luciférase, simple à mesurer grâce aux caméras de bioluminescence, n'a pas encore été développé à ce jour.

Le plasmide pLuc705 nous a aussi permis de mettre au point un système de modulation de l'expression du transgène, ici la luciférase en tant que transgène modèle. A l'inverse des cellules HeLa pLuc705 transfectées stablement, ce modèle utilise l'expression transitoire du même plasmide. Il existe plusieurs états d'expression du transgène :

1. le niveau de base ou bruit de fond : proche de zéro
2. l'expression totale du transgène : niveau élevé
3. des niveaux intermédiaires d'expression.

De cette manière, on pourrait donc contrôler quantitativement l'expression d'un gène, selon le taux d'expression souhaité ou nécessaire, tant au niveau spatial que temporel, en utilisant le même vecteur pour délivrer le plasmide puis les ON antisens.

#### **IV. DELIVRANCE DE siRNA.**

Comme vu précédemment, la formulation de DLS a été développée et optimisée pour la délivrance de siRNA anti-PAI-1 (Meryet-Figuières *et al.* 2007). En microscopie à fluorescence et à haute concentration, les lipoplexes ont été observés, au bout de 24h de transfection, dans les zones périnucléaires et dans le cytoplasme des cellules MDA-MB 231 (Lavigne *et al.* 2007 et données non publiées). La distribution des siRNA *in vitro* est donc différente de celle des ON antisens, qui s'accumulent clairement dans le noyau des cellules (Resina *et al.* 2007a et 2007b, Thierry *et al.* 2006). Rappelons que les ON antisens agissent sur les pré-ARNm dans le noyau, alors que les siRNA ont un effet sur les ARNm matures cytoplasmiques.

La lignée de cellules MDA-MB 231 est un modèle de cancer du sein très invasif et exprimant de forts taux de PAI-1. Contrairement à l'utilisation de la LFA, les siRNA anti-

PAI-1 délivrés avec le système DLS ont été à l'origine de 90% d'inhibition de la protéine sécrétée, ainsi que de l'ARNm de PAI-1. Ceci démontre que la délivrance des siRNA par les DLS s'est avérée très efficace, une fois optimisée.

De plus, une modification de l'aspect des cellules MBA-MB 231 a été observée lors du traitement, ainsi qu'une modification de leur adhérence et de leur nombre (données non publiées). Ces observations de routine nous laisse suggérer que l'inhibition de PAI-1 *in vitro* mène à une migration et à une prolifération moindre des cellules cancéreuses. Pour vérifier cette hypothèse, des expériences de migration et de prolifération en 3D ont été lancées, en collaboration avec l'équipe de Georgia Barlovatz-Meimon (laboratoire IBISC, FRE 2873 CNRS, Evry). Pour compléter ce travail, des expériences de Matrigel en 2D devraient être réalisées *in vitro*. Il aurait été intéressant de comparer *in vitro* plusieurs modèles de cancers du sein, tels que les cellules MCF7, qui sont moins invasives que les MDA-MB 231 et qui expriment moins de protéine PAI-1. *In vivo*, des souris Nude ou SCID pourraient être injectées avec des cellules cancéreuses de la lignée MBA-MB 231, suivies de plusieurs injections intra-tumorales ou bien i.v. de DLS-siRNA (ou bien de DLS-shRNA permettant une expression constitutive dans la cellule) dans la veine de la queue, pour observer si ces molécules ont le même potentiel thérapeutique *in vivo*. Selon la toxicité engendrée chez la souris à des concentrations efficaces d'AN, leur délivrance par les Nx, moins toxiques *in vivo*, pourrait être envisagée.

Dans le cadre d'une récente collaboration avec l'équipe de Florence Apparilly (U844 INSERM, Montpellier), des siRNA anti-TNF- $\alpha$  vont être délivrés via des DLS et des Nx, chez un modèle de souris présentant de l'arthrite rhumatoïde (Khoury *et al.* 2006). Ces expériences nous permettront de savoir si nos vecteurs sont efficaces *in vivo* et pendant combien de temps, et s'ils s'avèrent toxiques à des concentrations efficaces en siRNA. Selon la voie d'administration, nous saurons aussi si nos lipoplexes sont capables de cibler efficacement les tumeurs.

## V. PEPTIDES VERSUS LIPOPLEXES.

Les stratégies à base de peptides et de lipoplexes possèdent leurs avantages et leurs inconvénients propres pour vectoriser les AN, dont les ON. Comme vu précédemment (Thierry *et al.* 2006, Resina *et al.* 2007b), à ce jour les lipoplexes semblent conserver un avantage certain à plusieurs niveaux (voir Tableau 13).

**Tableau 13 : avantages et inconvénients actuels des 2 stratégies de vectorisation testées.**

STRATEGIE DE VECTORISATION	AVANTAGES	INCONVENIENTS
<b>PEPTIDES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Bonne efficacité de pénétration dans la cellule</li> <li>▶ Toxicité à très forte concentration (&gt; 2µM)</li> <li>▶ Synthèse chimique simple et rapide</li> <li>▶ Possibilité de synthétiser de nouveaux peptides originaux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Très faible pénétration des ON jusqu'au noyau cellulaire</li> <li>▶ Séquestration dans les endosomes ; utilisation d'agents endosomolytiques inenvisageable <i>in vivo</i></li> <li>▶ Coût de synthèse des peptides</li> </ul>
<b>LIPOPLEXES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Protection et condensation des ON</li> <li>▶ Bonne efficacité de pénétration dans la cellule</li> <li>▶ Pénétration des ON jusqu'au noyau cellulaire</li> <li>▶ Formulation et stabilité des particules</li> <li>▶ Peu ou pas de séquestration dans les endosomes</li> <li>▶ Possibilité de réaliser des complexes peu chargés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Toxicité à faible concentration (&gt; 300-500nM en milieu sans sérum, &gt; 1µM avec sérum)</li> <li>▶ Coût des lipides</li> <li>▶ Caractère cationique difficile à utiliser <i>in vivo</i></li> </ul>

Même si les lipoplexes ont une longueur d'avance sur les peptides à ce jour pour vectoriser les ON et corriger l'épissage alternatif anormal, le vecteur idéal n'a pas encore été conçu. Les efforts de nombreuses équipes de Recherche pour mettre au point un vecteur sans inconvénients sont loin d'être récompensés. L'idée d'allier les avantages des 2 systèmes motive encore plusieurs groupes, tel celui de V.P. Torchilin, mais se cantonne souvent à l'utilisation de TAT en tant que CPP.

L'idéal serait d'encapsuler un peptide lié à l'ON dans les liposomes pour le protéger. Après déstabilisation des membranes des endosomes par les lipides comme le DOPE, les peptides-ON seraient libérés près du noyau et pourraient y pénétrer via les pores. L'ON serait mieux protégé vis-à-vis des nucléases par la présence du peptide. Le facteur limitant de cette stratégie est évidemment les interactions et les charges répulsives entre les liposomes et les peptides. Certains de nos collaborateurs ont réussi à former des complexes entre des liposomes cationiques (DOTAP, DOPE), des AN (ADNp) et des peptides cationiques, avec une action synergique des 2 transporteurs (Trabulo *et al.* soumis).

A l'inverse, il serait envisageable de complexer l'ON dans le liposome, puis de greffer des peptides à la surface, comme ce qui est réalisé avec les molécules de PEG. L'inconvénient de cette stratégie serait certainement la cytotoxicité engendrée.

## VI. EVOLUTION DES LIPOSOMES.

Aujourd'hui, on assiste à 2 évolutions des liposomes : utiliser les lipoplexes « nus », ou bien utiliser le ciblage cellulaire ou aléatoire des molécules. En effet, l'adressage spécifique des molécules thérapeutiques vers un organe, un tissu ou une cellule cancéreuse constitue un enjeu important pour le traitement entre autres des maladies infectieuses, cancéreuses ou d'origine génétique.

### ♦ Ciblage cellulaire.

Dans nos complexes, des groupements favorables (NH<sub>2</sub>) sont exposés à la surface des particules grâce au DOPE, qui permet d'ancrer d'autres molécules. Le ciblage cellulaire pourrait permettre une plus grande activité des lipoplexes et en réduire la toxicité. Dans cette étude, nous nous sommes affranchi de ce critère car nous sommes confrontés à des problèmes antérieurs au ciblage : la stabilité, l'homogénéité, l'efficacité des particules, ainsi que leur reproductibilité. Le ciblage cellulaire n'est pas parfait, car ciblées ou non, les particules sont internalisées de façon indépendante dans les cellules, comme celles du système réticulo-endothélial. De ce point de vue, on gagnerait peu à cibler les lipoplexes, surtout lors d'injections systémiques chez l'animal. Cependant, le ciblage cellulaire pourrait certainement constituer un avantage lors d'expériences *ex vivo*, comme par exemple pour cibler des populations cellulaires minoritaires comme les cellules souches.

### ♦ Ciblage aléatoire.

Greffer des polymères de PEG à la surface des liposomes peut constituer une bonne alternative aux lipoplexes peu stables dans les milieux biologiques. Ces liposomes pégylés ou furtifs constituent la 2<sup>ème</sup> génération de liposomes. Ici aussi, nous nous sommes affranchi de ce critère car nos lipoplexes s'avèrent stables *in vitro* et *in vivo*. De plus, le PEG est un vecteur moins efficace que les Lx en terme de pénétration et de délivrance dans les cellules. La pégylation des liposomes offre cependant l'avantage de ne pas être reconnu comme étranger dans la circulation sanguine, donc les lipoplexes ne seront pas dégradés par ces macrophages hépatiques. Les molécules de PEG peuvent donc permettre une plus grande

disponibilité des complexes dans la circulation sanguine et augmenter leur durée de vie. Ce genre d'expériences pourrait être envisagées.

◆ Ciblage des cellules cancéreuses.

La 3<sup>ème</sup> génération s'oriente vers des liposomes pégylés et décorés d'acide folique par exemple, alliant les 2 types de ciblage. Cet acide folique permet aux liposomes de reconnaître spécifiquement les récepteurs à l'acide folique surexprimés dans les cellules cancéreuses et donc de les cibler dans une stratégie anticancéreuse, en diffusant passivement au travers de l'épithélium vasculaire discontinu au niveau d'un tissu tumoral. Ce ciblage des liposomes pourrait être évalué en véhiculant les siRNA anti-PAI-1 dans un modèle de cancer du sein *in vivo*.

## VII. PERSPECTIVES GENERALES.

Les études dans ce laboratoire m'ont donné l'opportunité d'utiliser 2 stratégies de vectorisation des ON, les peptides et les liposomes, mais également d'appliquer la délivrance des lipoplexes à 2 modèles cellulaires très intéressants. La suite logique de ces travaux est évidemment de passer à un stade plus avancé, c'est-à-dire *in vivo*. L'efficacité de délivrance des particules DLS et Nx, pour véhiculer de l'ADN et des ON, a déjà été démontrée chez la souris (Thierry *et al.* 1995, 1997) et le babouin (Tavittian *et al.* 2002). Les résultats très encourageants *in vitro* doivent être vérifiés *in vivo* sur l'animal de laboratoire, dans des modèles très précis :

- modèle de la  $\beta$ -thalassémie : essais de correction de l'épissage alternatif dans la lignée érythrocytaire ;
- modèle du cancer du sein : injections de cellules tumorales (MDA-MB 231, MCF7) chez la souris Nude ou SCID.

Très efficaces sur les modèles de cellules adhérentes, résistantes et tolérantes (HeLa, MDA-MB 231, MCF7, C10 MJ, KS Y-1), les lipoplexes transfectent plus difficilement les cellules primaires *in vitro*, ainsi que les cellules en suspension. Les liposomes DLS et Nx ont été testés sur plusieurs modèles de cellules primaires *in vitro* : cellules hématopoïétiques, fibroblastes, cellules progénitrices (Thierry *et al.* 1997, Aksentijevich *et al.* 1996, Lisziewicz *et al.* 1994). Par ailleurs, plusieurs groupes se sont attelés à transfecter les cellules dendritiques avec des liposomes dans des stratégies de vaccination (Foged *et al.* 2004, Mockey *et al.* 2007), avec succès. Des travaux restent à être réalisés pour améliorer les

propriétés physicochimiques de nos formulations pour permettre la transfection efficace *in vitro* et *in vivo* sur les cellules primaires. Pour y parvenir, les Nx semblent la formulation la plus appropriée, grâce à leur charge globale proche de la neutralité, les particules cationiques étant trop toxiques. Toutefois, les observations d'expériences *in vivo* notamment chez la souris, ou les cellules tumorales greffées, montrent un transfert d'AN efficace (Thierry *et al.* 1995, 1997).

Pour pouvoir atteindre un stade pré-clinique avec nos molécules, elles ne doivent pas présenter de toxicité à la dose d'ON efficace chez l'animal de laboratoire. L'administration systémique des DLS a déjà permis d'observer leur biodistribution chez la souris (Thierry *et al.* 1995) et les Nx chez le babouin (Tavitian *et al.* 2002) : cœur, poumons, foie, rate, muscle, rein, cerveau, vessie, moelle osseuse. L'expression du plasmide vectorisé a ainsi été retrouvée jusque 3 mois après administration. Les complexes anioniques et proches de la neutralité paraissent moins toxiques que ceux très cationiques. Les Nx semblent donc les molécules les plus appropriées, quant à leur charge proche de la neutralité, pour véhiculer les ON *in vivo*.

Il existe de nombreuses applications des lipoplexes, pour traiter des maladies génétiques et des cancers (voir Tableau 14). Dans de nombreuses pathologies, des mutations sont à l'origine d'un épissage alternatif anormal et la cause de cancers, de maladies héréditaires et neurologiques (Brinkman 2004, Srebrow *et al.* 2006, Scholzova *et al.* 2007, Venables 2006).



**Tableau 14 : applications possibles des lipoplexes pour les traitements de maladies génétiques et de cancers.**

PATHOLOGIE / CIBLE	STRATEGIE	REFERENCES
<b>β-Thalassémie</b>	Correction de l'épissage alternatif	Kang <i>et al.</i> 1998
<b>Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)</b>	Saut d'exon	Van Deutekom <i>et al.</i> 2001 Bremmer-Bout <i>et al.</i> 2004 Fletcher <i>et al.</i> 2006
<b>Progéria : syndrome de Hutchinson-Gilford (HGFS)</b>	Correction de l'épissage alternatif (présence d'un site cryptique)	Eriksson <i>et al.</i> 2003 Scaffidi <i>et al.</i> 2005
<b>Bcl-x</b> : régulation de l'apoptose <u>Applications</u> : cancers du sein, de la prostate	Réorientation de l'épissage vers l'isoforme pro-apoptotique Bcl-xS	Mercatante <i>et al.</i> 2001, 2002
<b>Arthrite Rhumatoïde</b>	siRNA, shRNA	Khoury <i>et al.</i> 2006
<b>Diverses cibles à des fins anti-cancéreuses</b> (ex : survivine)	siRNA, shRNA	Brinkman 2004 Overhoff <i>et al.</i> 2005 Srebrow <i>et al.</i> 2006

L'éventail de maladies que nous sommes potentiellement capables de traiter avec nos molécules est donc conséquent. La mise sur la marché de médicaments à base d'ON antisens, tel que le Vitravene<sup>TM</sup>, laisse entrevoir un bon espoir pour le développement de nouveaux médicaments thérapeutiques à base d'ON vectorisés par des lipides.

### VIII. CONCLUSION.

Il paraît à ce jour évident que le vecteur permettant une vectorisation optimale de molécules d'intérêt sans effets secondaires n'a pas encore été développé. Les efforts des vectorologistes se concentrent à la fois sur le développement et l'optimisation de molécules de délivrance non toxiques, ainsi que sur leur application en tant que médicament. Dans cette thèse, j'ai eu l'opportunité d'allier ces 2 aspects et j'ai montré que les lipides peuvent présenter un énorme potentiel pour délivrer des AN en tant que molécules thérapeutiques et ceci malgré la toxicité engendrée, leur principal facteur limitant.

Il apparaît qu'il faille adapter avec grande précaution les avantages et les inconvénients des lipides dans l'utilisation des Lx pour une application clinique, et de démontrer dans une 1<sup>ère</sup> phase de développement l'efficacité dans un modèle animal approprié à cette application clinique.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Abes S., Turner J. J., Ivanova G. D., Owen D., Williams D., Arzumanov A., Clair P., Gait M. J. and Lebleu B. Efficient splicing correction by PNA conjugation to an R6-Penetratin delivery peptide. *Nucleic Acids Res*, 2007a, **35**(13):4495-502.
- Abes S., Moulton H., Turner J., Clair P., Richard J. P., Iversen P., Gait M. J. and Lebleu B. Peptide-based delivery of nucleic acids: design, mechanism of uptake and applications to splice-correcting oligonucleotides. *Biochem Soc Trans*, 2007b, **35**(Pt 1):53-5.
- Abes S., Moulton H. M., Clair P., Prevot P., Youngblood D. S., Wu R. P., Iversen P. L. and Lebleu B. Vectorization of morpholino oligomers by the (R-Ahx-R)<sub>4</sub> peptide allows efficient splicing correction in the absence of endosomolytic agents. *J Control Release*, 2006, **116**(3):304-13.
- Abes S., Williams D., Prevot P., Thierry A., Gait M. J. and Lebleu B. Endosome trapping limits the efficiency of splicing correction by PNA-oligolysine conjugates. *J Control Release*, 2006, **110**(3):595-604.
- Agrawal S. Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1489**(1):53-68.
- Aigner A., Renneberg H., Bojunga J., Apel J., Nelson P. S. and Czubayko F. Ribozyme-targeting of a secreted FGF-binding protein (FGF-BP) inhibits proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene*, 2002, **21**(37):5733-42.
- Akhtar S., Kole R. and Juliano R. L. Stability of antisense DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera. *Life Sci*, 1991, **49**(24):1793-801.
- Aksentijevich I., Pastan I., Lunardi-Iskandar Y., Gallo R. C., Gottesman M. M. and Thierry A. R. In vitro and in vivo liposome-mediated gene transfer leads to human MDR1 expression in mouse bone marrow progenitor cells. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**(9):1111-22.
- Altmann K. H., Fabbro D., Dean N. M., Geiger T., Monia B. P., Muller M. and Nicklin P. Second-generation antisense oligonucleotides: structure-activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors. *Biochem Soc Trans*, 1996, **24**(3):630-7.
- Amantana A. and Iversen P. L. Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *Curr Opin Pharmacol*, 2005, **5**(5):550-5.
- Andres E. and Dimarcq J. L. [Cationic antimicrobial peptides: from innate immunity study to drug development. Up date]. *Med Mal Infect*, 2007, **37**(4):194-9.
- Andres E. and Dimarcq J. L. Clinical development of antimicrobial peptides. *Int J Antimicrob Agents*, 2005, **25**(5):448-9.

- Arora V., Devi G. R. and Iversen P. L. Neutrally charged phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers: uptake, efficacy and pharmacokinetics. *Curr Pharm Biotechnol*, 2004, **5**(5):431-9.
- Bajou K. [Role of PAI-1 plasminogen activator inhibitor in tumor invasion and angiogenesis]. *Bull Mem Acad R Med Belg*, 2002, **157**(5-6):313-8.
- Bajou K., Lewalle J. M., Martinez C. R., Soria C., Lu H., Noel A. and Foidart J. M. Human breast adenocarcinoma cell lines promote angiogenesis by providing cells with uPA-PAI-1 and by enhancing their expression. *Int J Cancer*, 2002, **100**(5):501-6.
- Bajou K., Noel A., Gerard R. D., Masson V., Brunner N., Holst-Hansen C., Skobe M., Fusenig N. E., Carmeliet P., Collen D. and Foidart J. M. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med*, 1998, **4**(8):923-8.
- Bangham A. D., Standish M. M. and Watkins J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*, 1965, **13**(1):238-52.
- Barron L. G., Meyer K. B. and Szoka F. C., Jr. Effects of complement depletion on the pharmacokinetics and gene delivery mediated by cationic lipid-DNA complexes. *Hum Gene Ther*, 1998, **9**(3):315-23.
- Batzri S. and Korn E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim Biophys Acta*, 1973, **298**(4):1015-9.
- Baudard M., Flotte T. R., Aran J. M., Thierry A. R., Pastan I., Pang M. G., Kearns W. G. and Gottesman M. M. Expression of the human multidrug resistance and glucocerebrosidase cDNAs from adeno-associated vectors: efficient promoter activity of AAV sequences and in vivo delivery via liposomes. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**(11):1309-22.
- Behlke M. A. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther*, 2006, **13**(4):644-70.
- Behr J.P. DNA strongly binds to micelles and vesicles containing lipopolyamines or lipointercalants. *Tetrahedron Letters*, 1986, **27**:5861-64.
- Behr J. P. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjug Chem*, 1994, **5**(5):382-9.
- Behr J. P., Demeneix B., Loeffler J. P. and Perez-Mutul J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, **86**(18):6982-6.
- Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M. and Hannon G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, **409**(6818):363-6.
- Bhattacharya S. and Haldar S. The effects of cholesterol inclusion on the vesicular membranes of cationic lipids. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1283**(1):21-30.

Bitko V., Musiyenko A., Shulyayeva O. and Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med*, 2005, **11**(1):50-5.

Blaese R. M. Steps toward gene therapy: 1. The initial trials. *Hosp Pract (Minneap)*, 1995, **30**(11):33-40.

Bonavaud S., Charriere-Bertrand C., Rey C., Leibovitch M. P., Pedersen N., Frisdal E., Planus E., Blasi F., Gherardi R. and Barlovatz-Meimon G. Evidence of a non-conventional role for the urokinase tripartite complex (uPAR/uPA/PAI-1) in myogenic cell fusion. *J Cell Sci*, 1997, **110** ( Pt 9)(1083-9.

Bottger M., Vogel F., Platzer M., Kiessling U., Grade K. and Strauss M. Condensation of vector DNA by the chromosomal protein HMG1 results in efficient transfection. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **950**(2):221-8.

Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B. and Behr J. P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, **92**(16):7297-301.

Braat A. K., van de Water S., Korving J. and Zivkovic D. A zebrafish vasa morphant abolishes vasa protein but does not affect the establishment of the germline. *Genesis*, 2001, **30**(3):183-5.

Bremmer-Bout M., Aartsma-Rus A., de Meijer E. J., Kaman W. E., Janson A. A., Vossen R. H., van Ommen G. J., den Dunnen J. T. and van Deutekom J. C. Targeted exon skipping in transgenic hDMD mice: A model for direct preclinical screening of human-specific antisense oligonucleotides. *Mol Ther*, 2004, **10**(2):232-40.

Brennecke J., Hipfner D. R., Stark A., Russell R. B. and Cohen S. M. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell*, 2003, **113**(1):25-36.

Brinkman B. M. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem*, 2004, **37**(7):584-94.

Brody E. N. and Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *J Biotechnol*, 2000, **74**(1):5-13.

Brown M. D., Schatzlein A. G. and Uchegbu I. F. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm*, 2001, **229**(1-2):1-21.

Budker V., Gurevich V., Hagstrom J. E., Bortzov F. and Wolff J. A. pH-sensitive, cationic liposomes: a new synthetic virus-like vector. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**(6):760-4.

Calin G. A., Sevignani C., Dumitru C. D., Hyslop T., Noch E., Yendamuri S., Shimizu M., Rattan S., Bullrich F., Negrini M. and Croce C. M. Human microRNA genes are

frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**(9):2999-3004.

Cao A., Briane D., Coudert R., Vassy J., Lievre N., Olsman E., Tamboise E., Salzmann J. L., Rigaut J. P. and Taillandier E. Delivery and pathway in MCF7 cells of DNA vectorized by cationic liposomes derived from cholesterol. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2000, **10**(5):369-80.

Cavazzana-Calvo M. and Fischer A. Efficacy of gene therapy for SCID is being confirmed. *Lancet*, 2004, **364**(9452):2155-6.

Cavazzana-Calvo M., Lagresle C., Hacein-Bey-Abina S. and Fischer A. Gene therapy for severe combined immunodeficiency. *Annu Rev Med*, 2005, **56**(585-602).

Cavazzana-Calvo M., Thrasher A. and Mavilio F. The future of gene therapy. *Nature*, 2004, **427**(6977):779-81.

Cech T. R., Zaug A. J. and Grabowski P. J. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*, 1981, **27**(3 Pt 2):487-96.

Chan J. H., Lim S. and Wong W. S. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, **33**(5-6):533-40.

Chauveau F., Pestourie C. and Tavitian B. [Aptamers: selection and scope of applications]. *Pathol Biol (Paris)*, 2006, **54**(4):251-8.

Chavany C., Le Doan T., Couvreur P., Puisieux F. and Helene C. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as polymeric carriers for antisense oligonucleotides. *Pharm Res*, 1992, **9**(4):441-9.

Chazaud B., Bonavaud S., Plonquet A., Pouchelet M., Gherardi R. K. and Barlovatz-Meimon G. Involvement of the [uPAR:uPA:PAI-1:LRP] complex in human myogenic cell motility. *Exp Cell Res*, 2000, **258**(2):237-44.

Chazaud B., Ricoux R., Christov C., Plonquet A., Gherardi R. K. and Barlovatz-Meimon G. Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations. *Am J Pathol*, 2002, **160**(1):237-46.

Chemin I., Moradpour D., Wieland S., Offensperger W. B., Walter E., Behr J. P. and Blum H. E. Liver-directed gene transfer: a linear polyethylenimine derivative mediates highly efficient DNA delivery to primary hepatocytes in vitro and in vivo. *J Viral Hepat*, 1998, **5**(6):369-75.

Chen X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, 2004, **303**(5666):2022-5.

Chen X., Li N. and Ellington A. D. Ribozyme catalysis of metabolism in the RNA world. *Chem Biodivers*, 2007, **4**(4):633-55.

Chiarantini L., Cerasi A., Fraternali A., Millo E., Benatti U., Sparnacci K., Laus M., Ballestri M. and Tondelli L. Comparison of novel delivery systems for antisense peptide nucleic acids. *J Control Release*, 2005, **109**(1-3):24-36.

Chin D. J., Green G. A., Zon G., Szoka F. C., Jr. and Straubinger R. M. Rapid nuclear accumulation of injected oligodeoxyribonucleotides. *New Biol*, 1990, **2**(12):1091-100.

Chung H., Kim T. W., Kwon M., Kwon I. C. and Jeong S. Y. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. *J Control Release*, 2001, **71**(3):339-50.

Clamme J. P., Krishnamoorthy G. and Mely Y. Intracellular dynamics of the gene delivery vehicle polyethylenimine during transfection: investigation by two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1617**(1-2):52-61.

Clarke R. J. and Lupfert C. Influence of anions and cations on the dipole potential of phosphatidylcholine vesicles: a basis for the Hofmeister effect. *Biophys J*, 1999, **76**(5):2614-24.

Conwell C. C. and Huang L. Recent advances in non-viral gene delivery. *Adv Genet*, 2005, **53**(3-18).

Corcos L. and Solier S. [Alternative mRNA splicing, pathology and molecular therapeutics]. *Med Sci (Paris)*, 2005, **21**(3):253-60.

Cortesi R., Esposito E., Gambarin S., Telloli P., Menegatti E. and Nastruzzi C. Preparation of liposomes by reverse-phase evaporation using alternative organic solvents. *J Microencapsul*, 1999, **16**(2):251-6.

Couzin J. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science*, 2002, **298**(5602):2296-7.

Crooke S. T. Progress in antisense technology. *Annu Rev Med*, 2004, **55**(61-95).

Crooke S. T., Grillone L. R., Tendolkar A., Garrett A., Fratkin M. J., Leeds J. and Barr W. H. A pharmacokinetic evaluation of <sup>14</sup>C-labeled afovirsen sodium in patients with genital warts. *Clin Pharmacol Ther*, 1994, **56**(6 Pt 1):641-6.

Czekay R. P. and Loskutoff D. J. Unexpected role of plasminogen activator inhibitor 1 in cell adhesion and detachment. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2004, **229**(11):1090-6.

da Cruz M. T., Simoes S., Pires P. P., Nir S. and de Lima M. C. Kinetic analysis of the initial steps involved in lipoplex--cell interactions: effect of various factors that influence transfection activity. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1510**(1-2):136-51.

Dallas A. and Vlassov A. V. RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. *Med Sci Monit*, 2006, **12**(4):RA67-74.

- Dass C. R. Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. *J Mol Med*, 2004, **82**(9):579-91.
- Dass C. R. and Choong P. F. Selective gene delivery for cancer therapy using cationic liposomes: in vivo proof of applicability. *J Control Release*, 2006, **113**(2):155-63.
- Dass C. R., Walker T. L. and Burton M. A. Liposomes containing cationic dimethyl dioctadecyl ammonium bromide: formulation, quality control, and lipofection efficiency. *Drug Deliv*, 2002, **9**(1):11-8.
- de Lima M. C., Simoes S., Pires P., Gaspar R., Slepushkin V. and Duzgunes N. Gene delivery mediated by cationic liposomes: from biophysical aspects to enhancement of transfection. *Mol Membr Biol*, 1999, **16**(1):103-9.
- De Smedt S. C., Demeester J. and Hennink W. E. Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm Res*, 2000, **17**(2):113-26.
- Deamer D. and Bangham A. D. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim Biophys Acta*, 1976, **443**(3):629-34.
- Deamer D. W. and Barchfeld G. L. Encapsulation of macromolecules by lipid vesicles under simulated prebiotic conditions. *J Mol Evol*, 1982, **18**(3):203-6.
- Deamer D. W. and Bramhall J. Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. *Chem Phys Lipids*, 1986, **40**(2-4):167-88.
- Deamer D. W. and Nichols J. W. Proton-hydroxide permeability of liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983, **80**(1):165-8.
- DeLong R. K., Yoo H., Alahari S. K., Fisher M., Short S. M., Kang S. H., Kole R., Janout V., Regan S. L. and Juliano R. L. Novel cationic amphiphiles as delivery agents for antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27**(16):3334-41.
- Derossi D., Joliot A. H., Chassaing G. and Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*, 1994, **269**(14):10444-50.
- Dimitriadis G. J. Entrapment of plasmid DNA in liposomes. *Nucleic Acids Res*, 1979, **6**(8):2697-705.
- Dobrzynski E. and Herzog R. W. Tolerance induction by viral in vivo gene transfer. *Clin Med Res*, 2005, **3**(4):234-40.
- Doherty E. A. and Doudna J. A. Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biochem*, 2000, **69**:597-615.
- Dorsett Y. and Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, **3**(4):318-29.



- Dostie J., Mourelatos Z., Yang M., Sharma A. and Dreyfuss G. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *Rna*, 2003, **9**(2):180-6.
- Drolet D. W., Nelson J., Tucker C. E., Zack P. M., Nixon K., Bolin R., Judkins M. B., Farmer J. A., Wolf J. L., Gill S. C. and Bendele R. A. Pharmacokinetics and safety of an anti-vascular endothelial growth factor aptamer (NX1838) following injection into the vitreous humor of rhesus monkeys. *Pharm Res*, 2000, **17**(12):1503-10.
- Dudley N. R. and Goldstein B. RNA interference: silencing in the cytoplasm and nucleus. *Curr Opin Mol Ther*, 2003, **5**(2):113-7.
- Duffy M. J. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des*, 2004, **10**(1):39-49.
- Duzgune, scedil and Nir S. Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, **40**(1-2):3-18.
- Duzgunes N., Goldstein J. A., Friend D. S. and Felgner P. L. Fusion of liposomes containing a novel cationic lipid, N-[2,3-(dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium: induction by multivalent anions and asymmetric fusion with acidic phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 1989, **28**(23):9179-84.
- Eckstein F. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2000, **10**(2):117-21.
- Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S. M., Driver D. A., Berg R. H., Kim S. K., Norden B. and Nielsen P. E. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*, 1993, **365**(6446):566-8.
- Egilmez N. K., Iwanuma Y. and Bankert R. B. Evaluation and optimization of different cationic liposome formulations for in vivo gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **221**(1):169-73.
- Ekker S. C. and Larson J. D. Morphant technology in model developmental systems. *Genesis*, 2001, **30**(3):89-93.
- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. and Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **411**(6836):494-8.
- Ellis J. and Bernstein A. Gene targeting with retroviral vectors: recombination by gene conversion into regions of nonhomology. *Mol Cell Biol*, 1989, **9**(4):1621-7.
- Elouahabi A. and Ruyschaert J. M. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol Ther*, 2005, **11**(3):336-47.
- Erbacher P., Zou S., Bettinger T., Steffan A. M. and Remy J. S. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res*, 1998, **15**(9):1332-9.

- Eriksson M., Brown W. T., Gordon L. B., Glynn M. W., Singer J., Scott L., Erdos M. R., Robbins C. M., Moses T. Y., Berglund P., Dutra A., Pak E., Durkin S., Csoka A. B., Boehnke M., Glover T. W. and Collins F. S. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 2003, **423**(6937):293-8.
- Ewert K. K., Evans H. M., Zidovska A., Boussein N. F., Ahmad A. and Safinya C. R. A columnar phase of dendritic lipid-based cationic liposome-DNA complexes for gene delivery: hexagonally ordered cylindrical micelles embedded in a DNA honeycomb lattice. *J Am Chem Soc*, 2006, **128**(12):3998-4006.
- Famulok M., Blind M. and Mayer G. Intramers as promising new tools in functional proteomics. *Chem Biol*, 2001, **8**(10):931-9.
- Farhood H., Bottega R., Epand R. M. and Huang L. Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1111**(2):239-46.
- Farhood H., Serbina N. and Huang L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1235**(2):289-95.
- Fattal E., Couvreur P. and Dubernet C. "Smart" delivery of antisense oligonucleotides by anionic pH-sensitive liposomes. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, **56**(7):931-46.
- Felgner J. H., Kumar R., Sridhar C. N., Wheeler C. J., Tsai Y. J., Border R., Ramsey P., Martin M. and Felgner P. L. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem*, 1994, **269**(4):2550-61.
- Felgner P. L., Barenholz Y., Behr J. P., Cheng S. H., Cullis P., Huang L., Jessee J. A., Seymour L., Szoka F., Thierry A. R., Wagner E. and Wu G. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther*, 1997, **8**(5):511-2.
- Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M. and Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, **84**(21):7413-7.
- Ferrari M. E., Nguyen C. M., Zelphati O., Tsai Y. and Felgner P. L. Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes. *Hum Gene Ther*, 1998, **9**(3):341-51.
- Ferrari S., Moro E., Pettenazzo A., Behr J. P., Zacchello F. and Scarpa M. ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 1997, **4**(10):1100-6.
- Filipowicz W., Jaskiewicz L., Kolb F. A. and Pillai R. S. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, **15**(3):331-41.

- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E. and Mello C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391**(6669):806-11.
- Fischer A., Hacein-Bey S. and Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol*, 2002, **2**(8):615-21.
- Fischer D., Bieber T., Li Y., Elsassner H. P. and Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res*, 1999, **16**(8):1273-9.
- Fletcher S., Honeyman K., Fall A. M., Harding P. L., Johnsen R. D. and Wilton S. D. Dystrophin expression in the mdx mouse after localised and systemic administration of a morpholino antisense oligonucleotide. *J Gene Med*, 2006, **8**(2):207-16.
- Floch V., Loisel S., Guenin E., Herve A. C., Clement J. C., Yaouanc J. J., des Abbayes H. and Ferec C. Cation substitution in cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity. *J Med Chem*, 2000, **43**(24):4617-28.
- Foekens J. A., Schmitt M., van Putten W. L., Peters H. A., Kramer M. D., Janicke F. and Klijn J. G. Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol*, 1994, **12**(8):1648-58.
- Foged C., Arigita C., Sundblad A., Jiskoot W., Storm G. and Frokjaer S. Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: effect of bilayer composition. *Vaccine*, 2004, **22**(15-16):1903-13.
- Foglieni C., Bragonzi A., Cortese M., Cantu L., Boletta A., Chiossone I., Soria M. R. and Monaco L. Glomerular filtration is required for transfection of proximal tubular cells in the rat kidney following injection of DNA complexes into the renal artery. *Gene Ther*, 2000, **7**(4):279-85.
- Freedland S. J., Malone R. W., Borchers H. M., Zadourian Z., Malone J. G., Bennett M. J., Nantz M. H., Li J. H., Gumerlock P. H. and Erickson K. L. Toxicity of cationic lipid-ribozyme complexes in human prostate tumor cells can mimic ribozyme activity. *Biochem Mol Med*, 1996, **59**(2):144-53.
- Freimark B. D., Blezinger H. P., Florack V. J., Nordstrom J. L., Long S. D., Deshpande D. S., Nochumson S. and Petrak K. L. Cationic lipids enhance cytokine and cell influx levels in the lung following administration of plasmid: cationic lipid complexes. *J Immunol*, 1998, **160**(9):4580-6.
- Fretz M. M., Koning G. A., Mastrobattista E., Jiskoot W. and Storm G. OVCAR-3 cells internalize TAT-peptide modified liposomes by endocytosis. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1665**(1-2):48-56.
- Fretz M. M., Mastrobattista E., Koning G. A., Jiskoot W. and Storm G. Strategies for cytosolic delivery of liposomal macromolecules. *Int J Pharm*, 2005, **298**(2):305-9.

Friend D. S., Papahadjopoulos D. and Debs R. J. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1278**(1):41-50.

Fritz J. D., Herweijer H., Zhang G. and Wolff J. A. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**(12):1395-404.

Furdon P. J., Dominski Z. and Kole R. RNase H cleavage of RNA hybridized to oligonucleotides containing methylphosphonate, phosphorothioate and phosphodiester bonds. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17**(22):9193-204.

Gabizon A., Isacson R., Libson E., Kaufman B., Uziely B., Catane R., Ben-Dor C. G., Rabello E., Cass Y., Peretz T. and et al. Clinical studies of liposome-encapsulated doxorubicin. *Acta Oncol*, 1994, **33**(7):779-86.

Gagnor C., Rayner B., Leonetti J. P., Imbach J. L. and Lebleu B. Alpha-DNA.IX: Parallel annealing of alpha-anomeric oligodeoxyribonucleotides to natural mRNA is required for interference in RNase H mediated hydrolysis and reverse transcription. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17**(13):5107-14.

Gallo M., Montserrat J. M. and Iribarren A. M. Design and applications of modified oligonucleotides. *Braz J Med Biol Res*, 2003, **36**(2):143-51.

Gao X. and Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **179**(1):280-5.

Garcia L., Bunuales M., Duzgunes N. and Tros de Ilarduya C. Serum-resistant lipopolyplexes for gene delivery to liver tumour cells. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, **67**(1):58-66.

Garcia R. A., Pantazatos S. P., Pantazatos D. P. and MacDonald R. C. Cholesterol stabilizes hemifused phospholipid bilayer vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1511**(2):264-70.

Garcia-Blanco M. A., Baraniak A. P. and Lasda E. L. Alternative splicing in disease and therapy. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**(5):535-46.

Geary R. S., Henry S. P. and Grillone L. R. Fomivirsen: clinical pharmacology and potential drug interactions. *Clin Pharmacokinet*, 2002, **41**(4):255-60.

Geary R. S., Yu R. Z. and Levin A. A. Pharmacokinetics of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides. *Curr Opin Investig Drugs*, 2001, **2**(4):562-73.

Gemignani F., Landi S., DeMarini D. M. and Kole R. Spontaneous and MNNG-induced reversion of an EGFP construct in HeLa cells: an assay for observing mutations in living cells by fluorescent microscopy. *Hum Mutat*, 2001, **18**(6):526-34.

Gemignani F., Sazani P., Morcos P. and Kole R. Temperature-dependent splicing of beta-globin pre-mRNA. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(21):4592-8.

Gershon H., Ghirlando R., Guttman S. B. and Minsky A. Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry*, 1993, **32**(28):7143-51.

Ghosh Y. K., Visweswariah S. S. and Bhattacharya S. Advantage of the ether linkage between the positive charge and the cholesteryl skeleton in cholesterol-based amphiphiles as vectors for gene delivery. *Bioconjug Chem*, 2002, **13**(2):378-84.

Giladi H., Ketzinel-Gilad M., Rivkin L., Felig Y., Nussbaum O. and Galun E. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther*, 2003, **8**(5):769-76.

Godard G., Boutorine A. S., Saison-Behmoaras E. and Helene C. Antisense effects of cholesterol-oligodeoxynucleotide conjugates associated with poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *Eur J Biochem*, 1995, **232**(2):404-10.

Godbey W. T., Wu K. K. and Mikos A. G. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res*, 1999, **45**(3):268-75.

Golda A., Pelisek J., Klocke R., Engelmann M. G., Rolland P. H., Mekkaoui C. and Nikol S. Small poly-L-lysines improve cationic lipid-mediated gene transfer in vascular cells in vitro and in vivo. *J Vasc Res*, 2007, **44**(4):273-82.

Gordon S. P., Berezhna S., Scherfeld D., Kahya N. and Schwille P. Characterization of interaction between cationic lipid-oligonucleotide complexes and cellular membrane lipids using confocal imaging and fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J*, 2005, **88**(1):305-16.

Gorman L., Mercatante D. R. and Kole R. Restoration of correct splicing of thalassemic beta-globin pre-mRNA by modified U1 snRNAs. *J Biol Chem*, 2000, **275**(46):35914-9.

Gorman L., Suter D., Emerick V., Schumperli D. and Kole R. Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, **95**(9):4929-34.

Goryacheva Y. A., Vekshina O. M., Yashin V. A. and Kim Y. A. Fusion and endocytosis of anionic liposomes with Ehrlich ascitic carcinoma cells. *Bull Exp Biol Med*, 2005, **140**(6):733-5.

Graham F. L. and van der Eb A. J. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, 1973, **54**(2):536-9.

Grondahl-Hansen J., Christensen I. J., Briand P., Pappot H., Mouridsen H. T., Blichert-Toft M., Dano K. and Brunner N. Plasminogen activator inhibitor type 1 in cytosolic tumor extracts predicts prognosis in low-risk breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 1997, **3**(2):233-9.

Grondahl-Hansen J., Christensen I. J., Rosenquist C., Brunner N., Mouridsen H. T., Dano K. and Blichert-Toft M. High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res*, 1993, **53**(11):2513-21.

Grondahl-Hansen J., Hilsenbeck S. G., Christensen I. J., Clark G. M., Osborne C. K. and Brunner N. Prognostic significance of PAI-1 and uPA in cytosolic extracts obtained from node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 1997, **43**(2):153-63.

Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N. and Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 1983, **35**(3 Pt 2):849-57.

Guild B. C., Mulligan R. C., Gros P. and Housman D. E. Retroviral transfer of a murine cDNA for multidrug resistance confers pleiotropic drug resistance to cells without prior drug selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, **85**(5):1595-9.

Guo W. and Lee R. J. Efficient gene delivery using anionic liposome-complexed polyplexes (LPDII). *Biosci Rep*, 2000, **20**(5):419-32.

Gupta B., Levchenko T. S. and Torchilin V. P. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, **57**(4):637-51.

Hamada M., Ohtsuka T., Kawaida R., Koizumi M., Morita K., Furukawa H., Imanishi T., Miyagishi M. and Taira K. Effects on RNA interference in gene expression (RNAi) in cultured mammalian cells of mismatches and the introduction of chemical modifications at the 3'-ends of siRNAs. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2002, **12**(5):301-9.

Hannon G. J. RNA interference. *Nature*, 2002, **418**(6894):244-51.

Harashima H., Shinohara Y. and Kiwada H. Intracellular control of gene trafficking using liposomes as drug carriers. *Eur J Pharm Sci*, 2001, **13**(1):85-9.

Harvie P., Dutzar B., Galbraith T., Cudmore S., O'Mahony D., Anklesaria P. and Paul R. Targeting of lipid-protamine-DNA (LPD) lipopolyplexes using RGD motifs. *J Liposome Res*, 2003, **13**(3-4):231-47.

Harvie P., Wong F. M. and Bally M. B. Characterization of lipid DNA interactions. I. Destabilization of bound lipids and DNA dissociation. *Biophys J*, 1998, **75**(2):1040-51.

Heasman J. Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev Biol*, 2002, **243**(2):209-14.

Hecke A., Brooks H., Meryet-Figuere M., Minne S., Konstantinides S., Hasenfuss G., Lebleu B. and Schafer K. Successful silencing of plasminogen activator inhibitor-1 in human vascular endothelial cells using small interfering RNA. *Thromb Haemost*, 2006, **95**(5):857-64.

- Heller L. C. and Heller R. In vivo electroporation for gene therapy. *Hum Gene Ther*, 2006, **17**(9):890-7.
- Herbert A. and Rich A. RNA processing and the evolution of eukaryotes. *Nat Genet*, 1999, **21**(3):265-9.
- Herdewijn P. Heterocyclic modifications of oligonucleotides and antisense technology. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2000, **10**(4):297-310.
- Hoekstra D., Rejman J., Wasungu L., Shi F. and Zuhorn I. Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome. *Biochem Soc Trans*, 2007, **35**(Pt 1):68-71.
- Hoekstra D. and Scherphof G. Effect of fetal calf serum and serum protein fractions on the uptake of liposomal phosphatidylcholine by rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Biochim Biophys Acta*, 1979, **551**(1):109-21.
- Hong K., Zheng W., Baker A. and Papahadjopoulos D. Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery. *FEBS Lett*, 1997, **400**(2):233-7.
- Hope M. J. and Cullis P. R. Lipid asymmetry induced by transmembrane pH gradients in large unilamellar vesicles. *J Biol Chem*, 1987, **262**(9):4360-6.
- Huang C. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 1969, **8**(1):344-52.
- Huber L. C., Distler O., Gay R. E. and Gay S. Antisense strategies in degenerative joint diseases: sense or nonsense? *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, **58**(2):285-99.
- Hudziak R. M., Barofsky E., Barofsky D. F., Weller D. L., Huang S. B. and Weller D. D. Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1996, **6**(4):267-72.
- Hui S. W., Langner M., Zhao Y. L., Ross P., Hurley E. and Chan K. The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophys J*, 1996, **71**(2):590-9.
- Huisman T. H. Levels of Hb A2 in heterozygotes and homozygotes for beta-thalassemia mutations: influence of mutations in the CACCC and ATAAA motifs of the beta-globin gene promoter. *Acta Haematol*, 1997, **98**(4):187-94.
- Humphreys D. T., Westman B. J., Martin D. I. and Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**(47):16961-6.
- Hutvagner G. and Zamore P. D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 2002, **297**(5589):2056-60.

- Hyndman L., Lemoine J. L., Huang L., Porteous D. J., Boyd A. C. and Nan X. HIV-1 Tat protein transduction domain peptide facilitates gene transfer in combination with cationic liposomes. *J Control Release*, 2004, **99**(3):435-44.
- Ibanez M., Gariglio P., Chavez P., Santiago R., Wong C. and Baeza I. Spermidine-condensed DNA and cone-shaped lipids improve delivery and expression of exogenous DNA transfer by liposomes. *Biochem Cell Biol*, 1996, **74**(5):633-43.
- Inoue K. Permeability properties of liposomes prepared from dipalmitoyllecithin, dimyristoyllecithin, egg lecithin, rat liver lecithin and beef brain sphingomyelin. *Biochim Biophys Acta*, 1974, **339**(3):390-402.
- Iversen P. L., Arora V., Acker A. J., Mason D. H. and Devi G. R. Efficacy of antisense morpholino oligomer targeted to c-myc in prostate cancer xenograft murine model and a Phase I safety study in humans. *Clin Cancer Res*, 2003, **9**(7):2510-9.
- Jacobson A. and Peltz S. W. Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*, 1996, **65**:693-739.
- Janicke F., Pache L., Schmitt M., Ulm K., Thomssen C., Prectl A. and Graeff H. Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissues are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1. *Cancer Res*, 1994, **54**(10):2527-30.
- Jayasena S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem*, 1999, **45**(9):1628-50.
- Johnson S. M., Bangham A. D., Hill M. W. and Korn E. D. Single bilayer liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1971, **233**(3):820-6.
- Jones M. N. The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. *Adv Colloid Interface Sci*, 1995, **54**:93-128.
- Jozkowicz A. and Dulak J. Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy. *Acta Biochim Pol*, 2005, **52**(3):589-99.
- Juliano R. L., Alahari S., Yoo H., Kole R. and Cho M. Antisense pharmacodynamics: critical issues in the transport and delivery of antisense oligonucleotides. *Pharm Res*, 1999, **16**(4):494-502.
- Kang S. H., Cho M. J. and Kole R. Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry*, 1998, **37**(18):6235-9.
- Kang S. H., Zirbes E. L. and Kole R. Delivery of antisense oligonucleotides and plasmid DNA with various carrier agents. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1999, **9**(6):497-505.



- Karkare S. and Bhatnagar D. Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**(5):575-86.
- Karras J. G., McKay R. A., Dean N. M. and Monia B. P. Deletion of individual exons and induction of soluble murine interleukin-5 receptor-alpha chain expression through antisense oligonucleotide-mediated redirection of pre-mRNA splicing. *Mol Pharmacol*, 2000, **58**(2):380-7.
- Kawasaki A. M., Casper M. D., Freier S. M., Lesnik E. A., Zounes M. C., Cummins L. L., Gonzalez C. and Cook P. D. Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets. *J Med Chem*, 1993, **36**(7):831-41.
- Khalil I. A., Kogure K., Futaki S. and Harashima H. High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression. *J Biol Chem*, 2006, **281**(6):3544-51.
- Khoury M., Louis-Pence P., Escriou V., Noel D., Largeau C., Cantos C., Scherman D., Jorgensen C. and Apparailly F. Efficient new cationic liposome formulation for systemic delivery of small interfering RNA silencing tumor necrosis factor alpha in experimental arthritis. *Arthritis Rheum*, 2006, **54**(6):1867-77.
- Khvorova A., Reynolds A. and Jayasena S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 2003, **115**(2):209-16.
- Kim Y. M., Choi K. H., Jang Y. J., Yu J. and Jeong S. Specific modulation of the anti-DNA autoantibody-nucleic acids interaction by the high affinity RNA aptamer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **300**(2):516-23.
- Kirby C. J. and Gregoriadis G. Preparation of liposomes containing factor VIII for oral treatment of haemophilia. *J Microencapsul*, 1984, **1**(1):33-45.
- Kirkham M. and Parton R. G. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1745**(3):273-86.
- Kole R. Modification of pre-mRNA splicing by antisense oligonucleotides. *Acta Biochim Pol*, 1997, **44**(2):231-7.
- Kole R. and Sazani P. Antisense effects in the cell nucleus: modification of splicing. *Curr Opin Mol Ther*, 2001, **3**(3):229-34.
- Kole R., Vacek M. and Williams T. Modification of alternative splicing by antisense therapeutics. *Oligonucleotides*, 2004, **14**(1):65-74.
- Kole R., Williams T. and Cohen L. RNA modulation, repair and remodeling by splice switching oligonucleotides. *Acta Biochim Pol*, 2004, **51**(2):373-8.

- Koltover I., Salditt T., Radler J. O. and Safinya C. R. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science*, 1998, **281**(5373):78-81.
- Koltover I., Salditt T. and Safinya C. R. Phase diagram, stability, and overcharging of lamellar cationic lipid-DNA self-assembled complexes. *Biophys J*, 1999, **77**(2):915-24.
- Koynova R., Wang L., Tarahovsky Y. and MacDonald R. C. Lipid phase control of DNA delivery. *Bioconjug Chem*, 2005, **16**(6):1335-9.
- Krawczak M., Reiss J. and Cooper D. N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet*, 1992, **90**(1-2):41-54.
- Kremer J. M., Esker M. W., Pathmamanoharan C. and Wiersema P. H. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry*, 1977, **16**(17):3932-5.
- Krichevsky A. M., King K. S., Donahue C. P., Khrapko K. and Kosik K. S. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *Rna*, 2003, **9**(10):1274-81.
- Kukowska-Latallo J. F., Bielinska A. U., Johnson J., Spindler R., Tomalia D. A. and Baker J. R., Jr. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, **93**(10):4897-902.
- Kumar M. and Carmichael G. G. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(4):1415-34.
- Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*, 2003, **270**(8):1628-44.
- Lacerra G., Sierakowska H., Carestia C., Fucharoen S., Summerton J., Weller D. and Kole R. Restoration of hemoglobin A synthesis in erythroid cells from peripheral blood of thalassemic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**(17):9591-6.
- Landen C. N., Jr., Chavez-Reyes A., Bucana C., Schmandt R., Deavers M. T., Lopez-Berestein G. and Sood A. K. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res*, 2005, **65**(15):6910-8.
- Lasic D. D. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol*, 1998, **16**(7):307-21.
- Lasic D. D. Colloid chemistry. Liposomes within liposomes. *Nature*, 1997, **387**(6628):26-7.
- Lavigne C. and Thierry A. R. Specific Subcellular Localization of siRNAs Delivered by Lipoplex in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Biochimie*, 2007, **89**(10):1245-1251.

Lavigne C., Lunardi-Iskandar Y., Lebleu B. and Thierry A. R. Cationic liposomes/lipids for oligonucleotide delivery: application to the inhibition of tumorigenicity of Kaposi's sarcoma by vascular endothelial growth factor antisense oligodeoxynucleotides. *Methods Enzymol*, 2004, **387**:189-210.

Lavigne C. and Thierry A. R. Enhanced antisense inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in cell cultures by DLS delivery system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **237**(3):566-71.

Lavigne C., Yelle J., Sauve G. and Thierry A. G. Lipid-based delivery of combinations of antisense oligodeoxynucleotides for the in vitro inhibition of HIV-1 replication. *AAPS PharmSci*, 2001, **3**(1):E7.

Lavigne C., Yelle J., Sauve G. and Thierry A. R. Is antisense an appropriate nomenclature or design for oligodeoxynucleotides aimed at the inhibition of HIV-1 replication? *AAPS PharmSci*, 2002, **4**(2):E9.

Lazar M. H., Christensen P. J., Du M., Yu B., Subbotina N. M., Hanson K. E., Hansen J. M., White E. S., Simon R. H. and Sisson T. H. Plasminogen activator inhibitor-1 impairs alveolar epithelial repair by binding to vitronectin. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, **31**(6):672-8.

Lebed O. I., Primak R. G. and Tishchenko R. I. [Complexing of bovine serum albumin with phosphatidyl choline liposomes]. *Ukr Biokhim Zh*, 1989, **61**(3):101-6.

Lechardeur D. and Lukacs G. L. Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr Gene Ther*, 2002, **2**(2):183-94.

Lechardeur D. and Lukacs G. L. Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous journey from the cytoplasm to the nucleus. *Hum Gene Ther*, 2006, **17**(9):882-9.

Lechardeur D., Verkman A. S. and Lukacs G. L. Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, **57**(5):755-67.

Lee E. R., Marshall J., Siegel C. S., Jiang C., Yew N. S., Nichols M. R., Nietupski J. B., Ziegler R. J., Lane M. B., Wang K. X., Wan N. C., Scheule R. K., Harris D. J., Smith A. E. and Cheng S. H. Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**(14):1701-17.

Lee K. D., Pitas R. E. and Papahadjopoulos D. Evidence that the scavenger receptor is not involved in the uptake of negatively charged liposomes by cells. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1111**(1):1-6.

Lee R. C., Feinbaum R. L. and Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, **75**(5):843-54.

- Lee R. J. and Huang L. Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J Biol Chem*, 1996, **271**(14):8481-7.
- Lele Z., Bakkers J. and Hammerschmidt M. Morpholino phenocopies of the swirl, snailhouse, somitabun, minifin, silberblick, and pipetail mutations. *Genesis*, 2001, **30**(3):190-4.
- Lemaître M., Bayard B. and Lebleu B. Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(3):648-652.
- Leonetti J. P., Machy P., Degols G., Lebleu B. and Leserman L. Antibody-targeted liposomes containing oligodeoxyribonucleotides complementary to viral RNA selectively inhibit viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, **87**(7):2448-51.
- Leonetti J. P., Mechti N., Degols G., Gagnor C. and Lebleu B. Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, **88**(7):2702-6.
- Leventis R. and Silvius J. R. Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1023**(1):124-32.
- Lewis D. L., Hagstrom J. E., Loomis A. G., Wolff J. A. and Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet*, 2002, **32**(1):107-8.
- Lewis D. L. and Wolff J. A. Systemic siRNA delivery via hydrodynamic intravascular injection. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, **59**(2-3):115-23.
- Li F., Ambrosini G., Chu E. Y., Plescia J., Tognin S., Marchisio P. C. and Altieri D. C. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 1998, **396**(6711):580-4.
- Lilley D. M. Structure, folding and mechanisms of ribozymes. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, **15**(3):313-23.
- Lim L. P., Glasner M. E., Yekta S., Burge C. B. and Bartel D. P. Vertebrate microRNA genes. *Science*, 2003, **299**(5612):1540.
- Lima R. T., Martins L. M., Guimaraes J. E., Sambade C. and Vasconcelos M. H. Specific downregulation of bcl-2 and xIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 2004, **11**(5):309-16.
- Lin M. T., Pulkkinen L., Uitto J. and Yoon K. The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy. *Int J Dermatol*, 2000, **39**(3):161-70.

Lingor P., Michel U., Scholl U., Bahr M. and Kugler S. Transfection of "naked" siRNA results in endosomal uptake and metabolic impairment in cultured neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **315**(4):1126-33.

Lisziewicz J., Sun D., Weichold F. F., Thierry A. R., Lusso P., Tang J., Gallo R. C. and Agrawal S. Antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate complementary to Gag mRNA blocks replication of human immunodeficiency virus type 1 in human peripheral blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, **91**(17):7942-6.

Litzinger D. C., Brown J. M., Wala I., Kaufman S. A., Van G. Y., Farrell C. L. and Collins D. Fate of cationic liposomes and their complex with oligonucleotide in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1281**(2):139-49.

Liu Y., Mounkes L. C., Liggitt H. D., Brown C. S., Solodin I., Heath T. D. and Debs R. J. Factors influencing the efficiency of cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**(2):167-73.

Loke S. L., Stein A., Zhang X. H., Mori K., Nakanishi M., Subasinghe C., Cohen J. S., Neckers L. M. Characterization of Oligonucleotide Transport into Living Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, **86**(10): 3474-3478.

Lopez A. J. Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu Rev Genet*, 1998, **32**:279-305.

Lorin A., Flore C., Thomas A., Brasseur R. Liposomes : description, preparation and applications. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 2004, **8**(3):163-176.

Lucas B., Remaut K., Sanders N. N., Braeckmans K., De Smedt S. C. and Demeester J. Towards a better understanding of the dissociation behavior of liposome-oligonucleotide complexes in the cytosol of cells. *J Control Release*, 2005, **103**(2):435-50.

Lukacs G. L., Haggie P., Seksek O., Lechardeur D., Freedman N. and Verkman A. S. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem*, 2000, **275**(3):1625-9.

Luna E. J. and McConnell H. M. The intermediate monoclinic phase of phosphatidylcholines. *Biochim Biophys Acta*, 1977, **466**(3):381-92.

Lunardi-Iskandar Y., Bryant J. L., Zeman R. A., Lam V. H., Samaniego F., Besnier J. M., Hermans P., Thierry A. R., Gill P. and Gallo R. C. Tumorigenesis and metastasis of neoplastic Kaposi's sarcoma cell line in immunodeficient mice blocked by a human pregnancy hormone. *Nature*, 1995, **375**(6526):64-8.

Luyten G. P., van der Spek C. W., Brand I., Sintnicolaas K., de Waard-Siebinga I., Jager M. J., de Jong P. T., Schrier P. I. and Luider T. M. Expression of MAGE, gp100 and tyrosinase genes in uveal melanoma cell lines. *Melanoma Res*, 1998, **8**(1):11-6.

Lv H., Zhang S., Wang B., Cui S. and Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release*, 2006, **114**(1):100-9.

MacDonald R. C., Jones F. D. and Qiu R. Fragmentation into small vesicles of dioleoylphosphatidylcholine bilayers during freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1191**(2):362-70.

MacDonald R. C., MacDonald R. I., Menco B. P., Takeshita K., Subbarao N. K. and Hu L. R. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1061**(2):297-303.

Madry H., Reszka R., Bohlender J. and Wagner J. Efficacy of cationic liposome-mediated gene transfer to mesangial cells in vitro and in vivo. *J Mol Med*, 2001, **79**(4):184-9.

Maitani Y., Igarashi S., Sato M. and Hattori Y. Cationic liposome (DC-Chol/DOPE=1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression. *Int J Pharm*, 2007, *in press*.

Malo M., Charriere-Bertrand C., Chettaoui C., Fabre-Guillevin E., Maquerlot F., Lackmy A., Vallee B., Delaplace F. and Barlovatz-Meimon G. [The PAI-1 swing: microenvironment and cancer cell migration]. *C R Biol*, 2006, **329**(12):919-27.

Maquerlot F., Galiacy S., Malo M., Guignabert C., Lawrence D. A., d'Ortho M. P. and Barlovatz-Meimon G. Dual role for plasminogen activator inhibitor type 1 as soluble and as matricellular regulator of epithelial alveolar cell wound healing. *Am J Pathol*, 2006, **169**(5):1624-32.

Marshall E. Gene therapy on trial. *Science*, 2000, **288**(5468):951-7.

Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 1999, **286**(5448):2244-5.

Marty C., Meylan C., Schott H., Ballmer-Hofer K. and Schwendener R. A. Enhanced heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of cell-penetrating peptide-modified liposomes. *Cell Mol Life Sci*, 2004, **61**(14):1785-94.

Mastrobattista E., Kapel R. H., Eggenhuisen M. H., Roholl P. J., Crommelin D. J., Hennink W. E. and Storm G. Lipid-coated polyplexes for targeted gene delivery to ovarian carcinoma cells. *Cancer Gene Ther*, 2001, **8**(6):405-13.

McCaffrey A. P., Meuse L., Karimi M., Contag C. H. and Kay M. A. A potent and specific morpholino antisense inhibitor of hepatitis C translation in mice. *Hepatology*, 2003, **38**(2):503-8.

McCaffrey A. P., Meuse L., Pham T. T., Conklin D. S., Hannon G. J. and Kay M. A. RNA interference in adult mice. *Nature*, 2002, **418**(6893):38-9.

McManus M. T. and Sharp P. A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*, 2002, **3**(10):737-47.

- Melino S., Rufini S., Sette M., Morero R., Grottesi A., Paci M. and Petruzzelli R. Zn(2+) ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin-5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain. *Biochemistry*, 1999, **38**(30):9626-33.
- Mello C. C. and Conte D., Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 2004, **431**(7006):338-42.
- Mercatante D. and Kole R. Modification of alternative splicing pathways as a potential approach to chemotherapy. *Pharmacol Ther*, 2000, **85**(3):237-43.
- Mercatante D. R., Bortner C. D., Cidlowski J. A. and Kole R. Modification of alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA in prostate and breast cancer cells. analysis of apoptosis and cell death. *J Biol Chem*, 2001, **276**(19):16411-7.
- Mercatante D. R. and Kole R. Control of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy: effects on gene expression. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1587**(2-3):126-32.
- Mercatante D. R., Mohler J. L. and Kole R. Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents. *J Biol Chem*, 2002, **277**(51):49374-82.
- Mercatante D. R., Sazani P. and Kole R. Modification of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy for cancer and other diseases. *Curr Cancer Drug Targets*, 2001, **1**(3):211-30.
- Meryet-Figuières M., Resina S., Lavigne C., Barlovatz-Meimon G., Lebleu B. and Thierry A. R. Inhibition of PAI-1 expression in breast cancer carcinoma cells by siRNA at nanomolar range. *Biochimie*, 2007, **89**(10):1228-1233.
- Metzler M., Wilda M., Busch K., Viehmann S. and Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004, **39**(2):167-9.
- Michael M. Z., SM O' Connor, van Holst Pellekaan N. G., Young G. P. and James R. J. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, 2003, **1**(12):882-91.
- Midoux P., Kichler A., Boutin V., Maurizot J. C. and Monsigny M. Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconjug Chem*, 1998, **9**(2):260-7.
- Midoux P., Mayer R. and Monsigny M. Membrane permeabilization by alpha-helical peptides: a flow cytometry study. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1239**(2):249-56.
- Midoux P., Mendes C., Legrand A., Raimond J., Mayer R., Monsigny M. and Roche A. C. Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**(4):871-8.

Midoux P. and Monsigny M. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug Chem*, 1999, **10**(3):406-11.

Milsmann M. H., Schwendener R. A. and Weder H. G. The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis. *Biochim Biophys Acta*, 1978, **512**(1):147-55.

Miseljic S., Galandiuk S., Myers S. D. and Wittliff J. L. Expression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in colon disease. *J Clin Lab Anal*, 1995, **9**(6):413-7.

Mitchell D. J., Kim D. T., Steinman L., Fathman C. G. and Rothbard J. B. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res*, 2000, **56**(5):318-25.

Mockey M., Bourseau E., Chandrashekhar V., Chaudhuri A., Lafosse S., Le Cam E., Quesniaux V. F., Ryffel B., Pichon C. and Midoux P. mRNA-based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes. *Cancer Gene Ther*, 2007, *in press*.

Mohr L., Yoon S. K., Eastman S. J., Chu Q., Scheule R. K., Scaglioni P. P., Geissler M., Heintges T., Blum H. E. and Wands J. R. Cationic liposome-mediated gene delivery to the liver and to hepatocellular carcinomas in mice. *Hum Gene Ther*, 2001, **12**(7):799-809.

Mok K. W. and Cullis P. R. Structural and fusogenic properties of cationic liposomes in the presence of plasmid DNA. *Biophys J*, 1997, **73**(5):2534-45.

Monkkonen J. and Urtti A. Lipid fusion in oligonucleotide and gene delivery with cationic lipids. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, **34**(1):37-49.

Moreau E., Domurado M., Chapon P., Vert M. and Domurad D. Biocompatibility of polycations: in vitro agglutination and lysis of red blood cells and in vivo toxicity. *J Drug Target*, 2002, **10**(2):161-73.

Morris M. C., Chaloin L., Mery J., Heitz F. and Divita G. A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27**(17):3510-7.

Morris M. C., Depollier J., Mery J., Heitz F. and Divita G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(12):1173-6.

Morris M. C., Vidal P., Chaloin L., Heitz F. and Divita G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**(14):2730-6.

Morrissey D. V., Lockridge J. A., Shaw L., Blanchard K., Jensen K., Breen W., Hartsough K., Machemer L., Radka S., Jadhav V., Vaish N., Zinnen S., Vargeese C., Bowman K., Shaffer C. S., Jeffs L. B., Judge A., MacLachlan I. and Polisky B. Potent



and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(8):1002-7.

Mortazavi S. M., Mohammadabadi M. R., Khosravi-Darani K. and Mozafari M. R. Preparation of liposomal gene therapy vectors by a scalable method without using volatile solvents or detergents. *J Biotechnol*, 2007, **129**(4):604-13.

Morvan F., Rayner B. and Imbach J. L. Alpha-oligonucleotides: a unique class of modified chimeric nucleic acids. *Anticancer Drug Des*, 1991, **6**(6):521-9.

Moulton H. M., Fletcher S., Neuman B. W., McClorey G., Stein D. A., Abes S., Wilton S. D., Buchmeier M. J., Lebleu B. and Iversen P. L. Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication in vivo. *Biochem Soc Trans*, 2007, **35**(Pt 4):826-8.

Mountain A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol*, 2000, **18**(3):119-28.

Mozafari M. R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell Mol Biol Lett*, 2005, **10**(4):711-9.

Mozafari M. R., Reed C. J., Rostron C., Kocum C. and Piskin E. Construction of stable anionic liposome-plasmid particles using the heating method: a preliminary investigation. *Cell Mol Biol Lett*, 2002, **7**(3):923-7.

Mukherjee K., Sen J. and Chaudhuri A. Common co-lipids, in synergy, impart high gene transfer properties to transfection-incompetent cationic lipids. *FEBS Lett*, 2005, **579**(5):1291-300.

Nabel G. J., Nabel E. G., Yang Z. Y., Fox B. A., Plautz G. E., Gao X., Huang L., Shu S., Gordon D. and Chang A. E. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, **90**(23):11307-11.

Naoi M., Naoi M., Shimizu T., Malviya A. N. and Yagi K. Permeability of amino acids into liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1977, **471**(2):305-10.

Napoli C., Lemieux C. and Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, 1990, **2**(4):279-289.

Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y. and Hofschneider P. H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J*, 1982, **1**(7):841-5.

Nichols B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci*, 2003, **116**(Pt 23):4707-14.

Nielsen H. J., Pappot H., Christensen I. J., Brunner N., Thorlacius-Ussing O., Moesgaard F., Dano K. and Grondahl-Hansen J. Association between plasma

concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and survival in patients with colorectal cancer. *Bmj*, 1998, **316**(7134):829-30.

Nogawa M., Yuasa T., Kimura S., Tanaka M., Kuroda J., Sato K., Yokota A., Segawa H., Toda Y., Kageyama S., Yoshiki T., Okada Y. and Maekawa T. Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest*, 2005, **115**(4):978-85.

Oberle V., de Jong G., Drayer J. I. and Hoekstra D. Efficient transfer of chromosome-based DNA constructs into mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1676**(3):223-30.

Olivieri N. F. The beta-thalassemyias. *N Engl J Med*, 1999, **341**(2):99-109.

Osborne S. E., Matsumura I. and Ellington A. D. Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects. *Curr Opin Chem Biol*, 1997, **1**(1):5-9.

Overhoff M., Alken M., Far R. K., Lemaitre M., Lebleu B., Sczakiel G. and Robbins I. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J Mol Biol*, 2005, **348**(4):871-81.

Palmer D. J. and Ng P. Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther*, 2005, **16**(1):1-16.

Papahadjopoulos D., Allen T. M., Gabizon A., Mayhew E., Matthay K., Huang S. K., Lee K. D., Woodle M. C., Lasic D. D., Redemann C. and et al. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, **88**(24):11460-4.

Papahadjopoulos D. and Miller N. Phospholipid model membranes. I. Structural characteristics of hydrated liquid crystals. *Biochim Biophys Acta*, 1967, **135**(4):624-38.

Papahadjopoulos D. and Watkins J. C. Phospholipid model membranes. II. Permeability properties of hydrated liquid crystals. *Biochim Biophys Acta*, 1967, **135**(4):639-52.

Pedersen H., Grondahl-Hansen J., Francis D., Osterlind K., Hansen H. H., Dano K. and Brunner N. Urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1 in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res*, 1994, **54**(1):120-3.

Pelisek J., Gaedtke L., DeRouchey J., Walker G. F., Nikol S. and Wagner E. Optimized lipopolyplex formulations for gene transfer to human colon carcinoma cells under in vitro conditions. *J Gene Med*, 2006, **8**(2):186-97.

Pendergrast P. S., Marsh H. N., Grate D., Healy J. M. and Stanton M. Nucleic acid aptamers for target validation and therapeutic applications. *J Biomol Tech*, 2005, **16**(3):224-34.

- Pestourie C., Tavitian B. and Duconge F. Aptamers against extracellular targets for in vivo applications. *Biochimie*, 2005, **87**(9-10):921-30.
- Pfeffer S., Zavolan M., Grasser F. A., Chien M., Russo J. J., Ju J., John B., Enright A. J., Marks D., Sander C. and Tuschl T. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 2004, **304**(5671):734-6.
- Pick U. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Arch Biochem Biophys*, 1981, **212**(1):186-94.
- Pillai R. S., Bhattacharyya S. N., Artus C. G., Zoller T., Cougot N., Basyuk E., Bertrand E. and Filipowicz W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 2005, **309**(5740):1573-6.
- Pires P., Simoes S., Nir S., Gaspar R., Duzgunes N. and Pedroso de Lima M. C. Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1418**(1):71-84.
- Pirollo K. F., Rait A., Slier L. S. and Chang E. H. Antisense therapeutics: from theory to clinical practice. *Pharmacol Ther*, 2003, **99**(1):55-77.
- Plank C., Oberhauser B., Mechtler K., Koch C. and Wagner E. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem*, 1994, **269**(17):12918-24.
- Plank C., Zauner W. and Wagner E. Application of membrane-active peptides for drug and gene delivery across cellular membranes. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, **34**(1):21-35.
- Planus E., Barlovatz-Meimon G., Rogers R. A., Bonavaud S., Ingber D. E. and Wang N. Binding of urokinase to plasminogen activator inhibitor type-1 mediates cell adhesion and spreading. *J Cell Sci*, 1997, **110** ( Pt 9)(1091-8.
- Pooga M., Hallbrink M., Zorko M. and Langel U. Cell penetration by transportan. *Faseb J*, 1998, **12**(1):67-77.
- Poznansky M. J. and Weglicki W. B. Lysophospholipid induced volume changes in lysosomes and in lysosomal lipid dispersions. *Biochem Biophys Res Commun*, 1974, **58**(4):1016-21.
- Puerta-Fernandez E., Romero-Lopez C., Barroso-delJesus A. and Berzal-Herranz A. Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, **27**(1):75-97.
- Que-Gewirth N. S. and Sullenger B. A. Gene therapy progress and prospects: RNA aptamers. *Gene Ther*, 2007, **14**(4):283-91.
- Radler J. O., Koltover I., Salditt T. and Safinya C. R. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*, 1997, **275**(5301):810-4.

- Rao N. M. and Gopal V. Cell biological and biophysical aspects of lipid-mediated gene delivery. *Biosci Rep*, 2006, **26**(4):301-24.
- Raper S. E., Chirmule N., Lee F. S., Wivel N. A., Bagg A., Gao G. P., Wilson J. M. and Batshaw M. L. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*, 2003, **80**(1-2):148-58.
- Rasmussen F. W., Bendifallah N., Zachar V., Shiraishi T., Fink T., Ebbesen P., Nielsen P. E. and Koppelhus U. Evaluation of transfection protocols for unmodified and modified peptide nucleic acid (PNA) oligomers. *Oligonucleotides*, 2006, **16**(1):43-57.
- Reilly D., Christensen L., Duch M., Nolan N., Duffy M. J. and Andreasen P. A. Type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast carcinomas. *Int J Cancer*, 1992, **50**(2):208-14.
- Reinhart B. J., Slack F. J., Basson M., Pasquinelli A. E., Bettinger J. C., Rougvie A. E., Horvitz H. R. and Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, **403**(6772):901-6.
- Rejman J., Oberle V., Zuhorn I. S. and Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*, 2004, **377**(Pt 1):159-69.
- Remaut K., Lucas B., Braeckmans K., Sanders N. N., Demeester J. and De Smedt S. C. Delivery of phosphodiester oligonucleotides: can DOTAP/DOPE liposomes do the trick? *Biochemistry*, 2006, **45**(6):1755-64.
- Resina S., Abes S., Turner J. J., Prevot P., Travo A., Clair P., Gait M. J., Thierry A. R. and Lebleu B. Lipoplex and peptide-based strategies for the delivery of steric-block oligonucleotides. *Int J Pharm*, 2007b, **344**(1-2):96-102.
- Resina S., Kole R., Travo A., Lebleu B. and Thierry A. R. Switching on transgene expression by correcting aberrant splicing using multi-targeting steric-blocking oligonucleotides. *J Gene Med*, 2007a, **9**(6):498-510.
- Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W. S. and Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**(3):326-30.
- Rhodes A., Deakin A., Spaul J., Coomber B., Aitken A., Life P. and Rees S. The generation and characterization of antagonist RNA aptamers to human oncostatin M. *J Biol Chem*, 2000, **275**(37):28555-61.
- Richard J. P., Melikov K., Brooks H., Prevot P., Lebleu B. and Chernomordik L. V. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem*, 2005, **280**(15):15300-6.

Richard J. P., Melikov K., Vives E., Ramos C., Verbeure B., Gait M. J., Chernomordik L. V. and Lebleu B. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*, 2003, **278**(1):585-90.

Rimmele M. Nucleic acid aptamers as tools and drugs: recent developments. *Chembiochem*, 2003, **4**(10):963-71.

Roberts J., Palma E., Sazani P., Orum H., Cho M. and Kole R. Efficient and persistent splice switching by systemically delivered LNA oligonucleotides in mice. *Mol Ther*, 2006, **14**(4):471-5.

Rosenzweig H. S., Rakhmanova V. A., McIntosh T. J. and MacDonald R. C. O-Alkyl dioleoylphosphatidylcholinium compounds: the effect of varying alkyl chain length on their physical properties and in vitro DNA transfection activity. *Bioconjug Chem*, 2000, **11**(3):306-13.

Rotenberg S. A. and Weinstein I. B. Two polychlorinated hydrocarbons cause phospholipid-dependent protein kinase C activation in vitro in the absence of calcium. *Mol Carcinog*, 1991, **4**(6):477-81.

Rothbard J. B., Garlington S., Lin Q., Kirschberg T., Kreider E., McGrane P. L., Wender P. A. and Khavari P. A. Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med*, 2000, **6**(11):1253-7.

Rupert L. A., van Breemen J. F., van Bruggen E. F., Engberts J. B. and Hoekstra D. Calcium-induced fusion of didodecylphosphate vesicles: the lamellar to hexagonal II (HII) phase transition. *J Membr Biol*, 1987, **95**(3):255-63.

Ruponen M., Honkakoski P., Ronkko S., Pelkonen J., Tammi M. and Urtti A. Extracellular and intracellular barriers in non-viral gene delivery. *J Control Release*, 2003, **93**(2):213-7.

Sarkar M. A., Roy S., Kole R. K. and Chowdhury A. Persistence and metabolism of imidacloprid in different soils of West Bengal. *Pest Manag Sci*, 2001, **57**(7):598-602.

Sazani P., Astriab-Fischer A. and Kole R. Effects of base modifications on antisense properties of 2'-O-methoxyethyl and PNA oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2003, **13**(3):119-28.

Sazani P., Gemignani F., Kang S. H., Maier M. A., Manoharan M., Persmark M., Bortner D. and Kole R. Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(12):1228-33.

Sazani P., Kang S. H., Maier M. A., Wei C., Dillman J., Summerton J., Manoharan M. and Kole R. Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(19):3965-74.

Sazani P. and Kole R. Modulation of alternative splicing by antisense oligonucleotides. *Prog Mol Subcell Biol*, 2003, **31**:217-39.

Sazani P. and Kole R. Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing. *J Clin Invest*, 2003, **112**(4):481-6.

Sazani P., Vacek M. M. and Kole R. Short-term and long-term modulation of gene expression by antisense therapeutics. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13**(5):468-72.

Scaffidi P. and Misteli T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med*, 2005, **11**(4):440-5.

Scanlon K. J. Anti-genes: siRNA, ribozymes and antisense. *Curr Pharm Biotechnol*, 2004, **5**(5):415-20.

Scaringe S. A. Advanced 5'-silyl-2'-orthoester approach to RNA oligonucleotide synthesis. *Methods Enzymol*, 2000, **317**(3-18).

Scherer L. and Rossi J. J. Recent applications of RNAi in mammalian systems. *Curr Pharm Biotechnol*, 2004, **5**(4):355-60.

Schieren H., Rudolph S., Finkelstein M., Coleman P. and Weissmann G. Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles: ESR, diffusion and entrapment analyses. *Biochim Biophys Acta*, 1978, **542**(1):137-53.

Schmutz M., Durand D., Debin A., Palvadeau Y., Etienne A. and Thierry A. R. DNA packing in stable lipid complexes designed for gene transfer imitates DNA compaction in bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96**(22):12293-8.

Scholzova E., Malik R., Sevcik J. and Kleibl Z. RNA regulation and cancer development. *Cancer Lett*, 2007, **246**(1-2):12-23.

Schwartz E., Cohen A. and Surrey S. Overview of the beta thalassemy: genetic and clinical aspects. *Hemoglobin*, 1988, **12**(5-6):551-64.

Scott W. G. Ribozymes. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, Shanguan T., Cabral-Lilly D., Purandare U., Godin N., Ahl P., Janoff A. and Meers P. A novel N-acyl phosphatidylethanolamine-containing delivery vehicle for spermine-condensed plasmid DNA. *Gene Ther*, 2000, **7**(9):769-83.

Shi J., Yan W. W., Qi X. R., Yang L. and Zhang L. [Biodistribution and hepatocytes targeting of cationic liposomes surface-modified with sterylglucoside and polyethylene glycol]. *Yao Xue Xue Bao*, 2004, **39**(7):551-5.

Shiota M., Sano M., Miyagishi M. and Taira K. Ribozymes: applications to functional analysis and gene discovery. *J Biochem (Tokyo)*, 2004, **136**(2):133-47.

Shiraishi T., Bendifallah N. and Nielsen P. E. Cellular delivery of polyheteroaromatic-peptide nucleic acid conjugates mediated by cationic lipids. *Bioconjug Chem*, 2006, **17**(1):189-94.

- Shoeman R. L., Hartig R., Huang Y., Grub S. and Traub P. Fluorescence microscopic comparison of the binding of phosphodiester and phosphorothioate (antisense) oligodeoxyribonucleotides to subcellular structures, including intermediate filaments, the endoplasmic reticulum, and the nuclear interior. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1997, **7**(4):291-308.
- Sier C. F., Vloedgraven H. J., Griffioen G., Ganesh S., Nagengast F. M., Lamers C. B. and Verspaget H. W. Plasminogen activators and inhibitor type 1 in neoplastic colonic tissue from patients with familial adenomatous polyposis. *Br J Cancer*, 1995, **71**(2):393-6.
- Sierakowska H., Agrawal S. and Kole R. Antisense oligonucleotides as modulators of pre-mRNA splicing. *Methods Mol Biol*, 2000, **133**(223-33).
- Sierakowska H., Gorman L., Kang S. H. and Kole R. Antisense oligonucleotides and RNAs as modulators of pre-mRNA splicing. *Methods Enzymol*, 2000, **313**(506-21).
- Sierakowska H., Sambade M. J., Agrawal S. and Kole R. Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, **93**(23):12840-4.
- Simberg D., Weisman S., Talmon Y. and Barenholz Y. DOTAP (and other cationic lipids): chemistry, biophysics, and transfection. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2004, **21**(4):257-317.
- Simeoni F., Morris M. C., Heitz F. and Divita G. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(11):2717-24.
- Singh S. K., Kumar R. and Wengel J. Synthesis of Novel Bicyclo[2.2.1] Ribonucleosides: 2'-Amino- and 2'-Thio-LNA Monomeric Nucleosides. *J Org Chem*, 1998, **63**(18):6078-6079.
- Sinn P. L., Sauter S. L. and McCray P. B., Jr. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene Ther*, 2005, **12**(14):1089-98.
- Sioud M. and Sorensen D. R. Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **312**(4):1220-5.
- Sioud M. and Sorensen D. R. Systemic delivery of synthetic siRNAs. *Methods Mol Biol*, 2004, **252**(515-22).
- Siwkowski A. M., Malik L., Esau C. C., Maier M. A., Wancewicz E. V., Albertshofer K., Monia B. P., Bennett C. F. and Eldrup A. B. Identification and functional validation of PNAs that inhibit murine CD40 expression by redirection of splicing. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(9):2695-706.

Song E., Lee S. K., Wang J., Ince N., Ouyang N., Min J., Chen J., Shankar P. and Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*, 2003, **9**(3):347-51.

Sorensen D. R., Leirdal M. and Sioud M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol*, 2003, **327**(4):761-6.

Soriano P., Dijkstra J., Legrand A., Spanjer H., Londos-Gagliardi D., Roerdink F., Scherphof G. and Nicolau C. Targeted and nontargeted liposomes for in vivo transfer to rat liver cells of a plasmid containing the preproinsulin I gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983, **80**(23):7128-31.

Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., John M., Kesavan V., Lavine G., Pandey R. K., Racie T., Rajeev K. G., Rohl I., Toudjarska I., Wang G., Wuschko S., Bumcrot D., Koteliansky V., Limmer S., Manoharan M. and Vornlocher H. P. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 2004, **432**(7014):173-8.

Spagnou S., Miller A. D. and Keller M. Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry*, 2004, **43**(42):13348-56.

Sproat B. S., Lamond A. I., Beijer B., Neuner P. and Ryder U. Highly efficient chemical synthesis of 2'-O-methyloligoribonucleotides and tetrabiotinylated derivatives; novel probes that are resistant to degradation by RNA or DNA specific nucleases. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17**(9):3373-86.

Srebrow A. and Kornblihtt A. R. The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci*, 2006, **119**(Pt 13):2635-41.

St George J. A. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther*, 2003, **10**(14):1135-41.

Staedel C., Remy J. S., Hua Z., Broker T. R., Chow L. T. and Behr J. P. High-efficiency transfection of primary human keratinocytes with positively charged lipopolyamine:DNA complexes. *J Invest Dermatol*, 1994, **102**(5):768-72.

Stein C. A. How to design an antisense oligodeoxynucleotide experiment: a consensus approach. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1998, **8**(2):129-32.

Stow N. D. and Wilkie N. M. An improved technique for obtaining enhanced infectivity with herpes simplex virus type 1 DNA. *J Gen Virol*, 1976, **33**(3):447-58.

Sullenger B. A. and Gilboa E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature*, 2002, **418**(6894):252-8.

Sullenger B. A., White R. R. and Rusconi C. P. Therapeutic aptamers and antidotes: a novel approach to safer drug design. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 2003, **43**:217-23.



- Summerton J. and Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1997, **7**(3):187-95.
- Sun W. H., Burkholder J. K., Sun J., Culp J., Turner J., Lu X. G., Pugh T. D., Ershler W. B. and Yang N. S. In vivo cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, **92**(7):2889-93.
- Suwanmanee T., Sierakowska H., Fucharoen S. and Kole R. Repair of a splicing defect in erythroid cells from patients with beta-thalassemia/HbE disorder. *Mol Ther*, 2002, **6**(6):718-26.
- Suwanmanee T., Sierakowska H., Lacerra G., Svasti S., Kirby S., Walsh C. E., Fucharoen S. and Kole R. Restoration of human beta-globin gene expression in murine and human IVS2-654 thalassemic erythroid cells by free uptake of antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol*, 2002, **62**(3):545-53.
- Szoka F., Jr. and Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978, **75**(9):4194-8.
- Tagami T., Barichello J. M., Kikuchi H., Ishida T. and Kiwada H. The gene-silencing effect of siRNA in cationic lipoplexes is enhanced by incorporating pDNA in the complex. *Int J Pharm*, 2007, **333**(1-2):62-9.
- Takai T. and Ohmori H. DNA transfection of mouse lymphoid cells by the combination of DEAE-dextran-mediated DNA uptake and osmotic shock procedure. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1048**(1):105-9.
- Talcott B. and Moore M. S. Getting across the nuclear pore complex. *Trends Cell Biol*, 1999, **9**(8):312-8.
- Tang M. X., Redemann C. T. and Szoka F. C., Jr. In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug Chem*, 1996, **7**(6):703-14.
- Tauskela J. S., Akler M. and Thompson M. The size dependence of cholate-dialyzed vesicles on phosphatidylcholine concentration. *Anal Biochem*, 1992, **201**(2):282-7.
- Tavitian B., Marzabal S., Boutet V., Kuhnast B., Terrazzino S., Moynier M., Dolle F., Deverre J. R. and Thierry A. R. Characterization of a synthetic anionic vector for oligonucleotide delivery using in vivo whole body dynamic imaging. *Pharm Res*, 2002, **19**(4):367-76.
- Tazi J., Durand S. and Jeanteur P. The spliceosome: a novel multi-faceted target for therapy. *Trends Biochem Sci*, 2005, **30**(8):469-78.
- Templeton N. S. Developments in liposomal gene delivery systems. *Expert Opin Biol Ther*, 2001, **1**(4):567-70.

Templeton N. S. Liposomal delivery of nucleic acids *in vivo*. *DNA and Cell Biol*, 2002, **21**(12):857-867.

Thierry A. R. and Dritschilo A. Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**(21):5691-8.

Thierry A. R., Rahman A. and Dritschilo A. Overcoming multidrug resistance in human tumor cells using free and liposomally encapsulated antisense oligodeoxynucleotides. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **190**(3):952-60.

Thierry A. R. and Mahan L. C. Therapeutic Applications of lipid-based Gene Delivery systems. In: *Advanced Gene Delivery*, A. Rolland (Ed.), 1998, 123.

Thierry A. R., Abes S., Resina S., Travo A., Richard J. P., Prevot P. and Lebleu B. Comparison of basic peptides- and lipid-based strategies for the delivery of splice correcting oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1758**(3):364-74.

Thierry A. R., Lunardi-Iskandar Y., Bryant J. L., Rabinovich P., Gallo R. C. and Mahan L. C. Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, **92**(21):9742-6.

Thierry A. R., Rabinovich P., Peng B., Mahan L. C., Bryant J. L. and Gallo R. C. Characterization of liposome-mediated gene delivery: expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA. *Gene Ther*, 1997, **4**(3):226-37.

Thierry A. R., Vives E., Richard J. P., Prevot P., Martinand-Mari C., Robbins I. and Lebleu B. Cellular uptake and intracellular fate of antisense oligonucleotides. *Curr Opin Mol Ther*, 2003, **5**(2):133-8.

Thierry A.R., Durand D., Schmutz M., and Lebleu B. DNA supramolecular self assemblies as a biomimetic complex system, *Emergent Properties in Natural and Artificial Dynamical Systems*, Springer, 2007, 103-120.

Thompson J. D. Applications of antisense and siRNAs during preclinical drug development. *Drug Discov Today*, 2002, **7**(17):912-7.

Tian H. and Kole R. Strong RNA splicing enhancers identified by a modified method of cycled selection interact with SR protein. *J Biol Chem*, 2001, **276**(36):33833-9.

Tomii Y. Lipid formulation as a drug carrier for drug delivery. *Curr Pharm Des*, 2002, **8**(6):467-74.

Torchilin V. P. Fluorescence microscopy to follow the targeting of liposomes and micelles to cells and their intracellular fate. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, **57**(1):95-109.

Torchilin V. P. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu Rev Biomed Eng*, 2006, **8**(343-75).

- Torchilin V. P. and Levchenko T. S. TAT-liposomes: a novel intracellular drug carrier. *Curr Protein Pept Sci*, 2003, **4**(2):133-40.
- Torchilin V. P., Levchenko T. S., Rammohan R., Volodina N., Papahadjopoulos-Sternberg B. and D'Souza G. G. Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**(4):1972-7.
- Torchilin V. P., Rammohan R., Weissig V. and Levchenko T. S. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**(15):8786-91.
- Tranchant I., Thompson B., Nicolazzi C., Mignet N. and Scherman D. Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids. *J Gene Med*, 2004, **6 Suppl 1**(S24-35).
- Tsai J. T., Furstoss K. J., Michnick T., Sloane D. L. and Paul R. W. Quantitative physical characterization of lipid-polycation-DNA lipopolyplexes. *Biotechnol Appl Biochem*, 2002, **36**(Pt 1):13-20.
- Tseng Y. L., Liu J. J. and Hong R. L. Translocation of liposomes into cancer cells by cell-penetrating peptides penetratin and tat: a kinetic and efficacy study. *Mol Pharmacol*, 2002, **62**(4):864-72.
- Tsuchiya H., Sunayama C., Okada G., Matsuda E., Tomita K. and Binder B. R. Plasminogen activator inhibitor-1 accelerates lung metastasis formation of human fibrosarcoma cells. *Anticancer Res*, 1997, **17**(1A):313-6.
- Ulrich A. S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep*, 2002, **22**(2):129-50.
- Umeda T., Eguchi Y., Okino K., Kodama M. and Hattori T. Cellular localization of urokinase-type plasminogen activator, its inhibitors, and their mRNAs in breast cancer tissues. *J Pathol*, 1997, **183**(4):388-97.
- Usman N. and Blatt L. M. Nuclease-resistant synthetic ribozymes: developing a new class of therapeutics. *J Clin Invest*, 2000, **106**(10):1197-202.
- Uster P. S. and Deamer D. W. pH-dependent fusion of liposomes using titratable polycations. *Biochemistry*, 1985, **24**(1):1-8.
- Vacek M., Sazani P. and Kole R. Antisense-mediated redirection of mRNA splicing. *Cell Mol Life Sci*, 2003, **60**(5):825-33.
- Vacek M. M., Ma H., Gemignani F., Lacerra G., Kafri T. and Kole R. High-level expression of hemoglobin A in human thalassemic erythroid progenitor cells following lentiviral vector delivery of an antisense snRNA. *Blood*, 2003, **101**(1):104-11.

- van der Krol A. R., Mur L. A., Beld M., Mol J. N. and Stuitje A. R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 1990, **2**(4):291-9.
- van Deutekom J. C., Bremmer-Bout M., Janson A. A., Ginjaar I. B., Baas F., den Dunnen J. T. and van Ommen G. J. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet*, 2001, **10**(15):1547-54.
- Vandenbroucke R. E., De Smedt S. C., Demeester J. and Sanders N. N. Cellular entry pathway and gene transfer capacity of TAT-modified lipoplexes. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1768**(3):571-9.
- Vemuri S. and Rhodes C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv*, 1995, **70**(2):95-111.
- Venables J. P. Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. *Bioessays*, 2006, **28**(4):378-86.
- Vermeulen A., Behlen L., Reynolds A., Wolfson A., Marshall W. S., Karpilow J. and Khvorova A. The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *Rna*, 2005, **11**(5):674-82.
- Vives E., Brodin P. and Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 1997, **272**(25):16010-7.
- Vives E., Richard J. P., Rispal C. and Lebleu B. TAT peptide internalization: seeking the mechanism of entry. *Curr Protein Pept Sci*, 2003, **4**(2):125-32.
- Wacheck V. and Zangemeister-Wittke U. Antisense molecules for targeted cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006, **59**(1):65-73.
- Wagner S. N., Atkinson M. J., Thanner S., Schmitt M., Wilhelm O., Rotter M. and Hofler H. Type-1 plasminogen activator inhibitor in human renal cell carcinoma. *J Pathol*, 1996, **179**(1):95-9.
- Walde P. and Ichikawa S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomol Eng*, 2001, **18**(4):143-77.
- Waltz D. A., Natkin L. R., Fujita R. M., Wei Y. and Chapman H. A. Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *J Clin Invest*, 1997, **100**(1):58-67.
- Wang J. and Manley J. L. Regulation of pre-mRNA splicing in metazoa. *Curr Opin Genet Dev*, 1997, **7**(2):205-11.

- Wang N., Planus E., Pouchelet M., Fredberg J. J. and Barlovatz-Meimon G. Urokinase receptor mediates mechanical force transfer across the cell surface. *Am J Physiol*, 1995, **268**(4 Pt 1):C1062-6.
- Wasungu L. and Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release*, 2006, **116**(2):255-64.
- Weiler J., Hunziker J. and Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther*, 2006, **13**(6):496-502.
- Wheeler C. J., Sukhu L., Yang G., Tsai Y., Bustamente C., Felgner P., Norman J. and Manthorpe M. Converting an alcohol to an amine in a cationic lipid dramatically alters the co-lipid requirement, cellular transfection activity and the ultrastructure of DNA-cytoskeleton complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1280**(1):1-11.
- White R. R., Sullenger B. A. and Rusconi C. P. Developing aptamers into therapeutics. *J Clin Invest*, 2000, **106**(8):929-34.
- Williams T. and Kole R. Analysis of prostate-specific membrane antigen splice variants in LNCap cells. *Oligonucleotides*, 2006, **16**(2):186-95.
- Wilusz C. J., Wormington M. and Peltz S. W. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2**(4):237-46.
- Wright M. J., Rosenthal E., Stewart L., Wightman L. M., Miller A. D., Latchman D. S. and Marber M. S. beta-Galactosidase staining following intracoronary infusion of cationic liposomes in the in vivo rabbit heart is produced by microinfarction rather than effective gene transfer: a cautionary tale. *Gene Ther*, 1998, **5**(3):301-8.
- Wrobel I. and Collins D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1235**(2):296-304.
- Wu G. Y. and Wu C. H. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem*, 1987, **262**(10):4429-32.
- Wu H., Lima W. F., Zhang H., Fan A., Sun H. and Crooke S. T. Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J Biol Chem*, 2004, **279**(17):17181-9.
- Xu P., Vernooy S. Y., Guo M. and Hay B. A. The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol*, 2003, **13**(9):790-5.
- Yamauchi M., Kusano H., Saito E., Iwata T., Nakakura M., Kato Y., Uochi T., Akinaga S. and Aoki N. Improved formulations of antisense oligodeoxynucleotides using wrapped liposomes. *J Control Release*, 2006, **114**(2):268-75.
- Yang Z. Y., Perkins N. D., Ohno T., Nabel E. G. and Nabel G. J. The p21 cyclin-dependent kinase inhibitor suppresses tumorigenicity in vivo. *Nat Med*, 1995, **1**(10):1052-6.

- Yano J., Hirabayashi K., Nakagawa S., Yamaguchi T., Nogawa M., Kashimori I., Naito H., Kitagawa H., Ishiyama K., Ohgi T. and Irimura T. Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, **10**(22):7721-6.
- Yoo H., Sazani P. and Juliano R. L. PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense oligonucleotides. *Pharm Res*, 1999, **16**(12):1799-804.
- Zamecnik P. C. and Stephenson M. L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978, **75**(1):280-4.
- Zellweger T., Miyake H., Cooper S., Chi K., Conklin B. S., Monia B. P. and Gleave M. E. Antitumor activity of antisense clusterin oligonucleotides is improved in vitro and in vivo by incorporation of 2'-O-(2-methoxy)ethyl chemistry. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, **298**(3):934-40.
- Zelphati O. and Szoka F. C., Jr. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, **93**(21):11493-8.
- Zender L., Hutker S., Liedtke C., Tillmann H. L., Zender S., Mundt B., Waltemathe M., Gosling T., Flemming P., Malek N. P., Trautwein C., Manns M. P., Kuhnel F. and Kubicka S. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**(13):7797-802.
- Zhang S., Xu Y., Wang B., Qiao W., Liu D. and Li Z. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Control Release*, 2004, **100**(2):165-80.
- Zhang X. and Godbey W. T. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, **58**(4):515-34.
- Zhang Y., Rong Qi X., Gao Y., Wei L., Maitani Y. and Nagai T. Mechanisms of co-modified liver-targeting liposomes as gene delivery carriers based on cellular uptake and antigens inhibition effect. *J Control Release*, 2007, **117**(2):281-90.
- Zuhorn I. S., Bakowsky U., Polushkin E., Visser W. H., Stuart M. C., Engberts J. B. and Hoekstra D. Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency. *Mol Ther*, 2005, **11**(5):801-10.
- Zuhorn I. S., Kalicharan R. and Hoekstra D. Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *J Biol Chem*, 2002, **277**(20):18021-8.

**Auteur :** Sarah RESINA

---

**Année :** 2007

---

**Titre :** Etude et Développement de Vecteurs Synthétiques pour la Délivrance d'Oligonucléotides à Visée Thérapeutique

---

**Résumé :** Une nouvelle approche thérapeutique est de moduler l'expression d'un gène en ciblant l'ARN messager par des oligonucléotides antisens et des siRNA. Nous avons étudié des formulations à base de lipides cationiques, formant des complexes particulières avec les acides nucléiques (lipoplexes) et aux propriétés transfectantes. Nous avons l'unique possibilité dans notre laboratoire de formuler les oligonucléotides dans des lipoplexes soit chargés positivement, soit chargés négativement. Nous avons démontré qu'ils protègent et vectorisent efficacement les acides nucléiques dans les cellules *in vitro* ainsi qu'*in vivo*. Ces vecteurs synthétiques possèdent de nombreux avantages : particules homogènes et de faible taille, reproductibilité, faible toxicité, stabilité au cours du temps et efficacité en présence de sérum. Nous avons appliqué ces vecteurs à la délivrance d'oligonucléotides antisens et de siRNA *in vitro*, respectivement dans un modèle de correction de l'épissage alternatif contenant l'intron aberrant de la  $\beta$ -thalassémie et dans un modèle de cancer du sein. Nos résultats démontrent une grande efficacité de délivrance des oligonucléotides via nos vecteurs lipidiques dans les 2 modèles, à faible concentration et en présence de sérum. Enfin, nous avons étudié le mécanisme d'entrée dans les cellules *in vitro* et évalué la proportion de transport actif (principalement endocytose), de transport passif (principalement fusion) et de fixation à la membrane des lipoplexes : celles-ci semblent dépendre du temps et du milieu de transfection, du type de formulation, de la charge ainsi que de la taille des complexes. Des études *in vivo* doivent être poursuivies pour évaluer l'efficacité et les propriétés respectives des différentes formulations développées, dans les modèles de correction de l'épissage alternatif et de cancer du sein.

---

**Mots-clés :** oligonucléotides antisens, siRNA, formulation, lipoplexes, vectorisation, correction de l'épissage alternatif, cancer du sein, voie d'internalisation cellulaire

---

**Title:** Study and Development of Synthetic Vectors for the Delivery of Therapeutic Oligonucleotides

---

**Abstract:** A new therapeutic approach is to modulate the expression of a gene by targeting mRNA by oligonucleotides (i.e. antisense or siRNA). We studied formulations based on cationic lipids, forming particle complexes with nucleic acids (lipoplexes) making possible oligonucleotide protection and delivery. In our laboratory, we have the unique ability to formulate oligonucleotides within lipoplexes, globally charged either positively or negatively. We showed that they protect and efficiently vectorize nucleic acids in cells *in vitro* as well as *in vivo*. These synthetic vectors have various advantages: homogeneous particles and with small sized, reproductibility, poor toxicity, stability in time and efficiency in the presence of serum. We applied these vectors to the delivery of antisense oligonucleotides and siRNA *in vitro*, respectively in a model of splicing correction containing the aberrant intron of  $\beta$ -thalassemia and in a model of breast cancer. Our results showed that our lipidic vectors provide a good efficiency in delivering oligonucleotides with using these 2 models, either at low concentration or in the presence of serum. Finally, we studied the cell uptake mechanism in cell culture and evaluated the proportion of active transport (principally endocytose), of passive transport (principally fusion) and of membrane fixation of lipoplexes: these seemed to depend on the incubation time, on the transfection medium, on the formulation, and on the global net charge as well as on the size of complexes. *In vivo* studies must be carried out to evaluate the efficiency and the respective properties of the different developed formulations, in splicing correction and breast cancer experimental animal models.

---

**Keywords:** antisense oligonucleotide, siRNA, formulation, lipoplex, drug delivery, vectorization, splicing correction, breast cancer, cell uptake

---

Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, UMR 5235.  
Département de Défenses Antivirales et Antitumorales.  
Université de Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 MONTPELLIER Cedex 5, FRANCE.