



HAL
open science

Développement, formulation et biodistribution de vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose

Nawal Belmadi

► **To cite this version:**

Nawal Belmadi. Développement, formulation et biodistribution de vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2015. Français. NNT : 2015BRES0093 . tel-01996412

HAL Id: tel-01996412

<https://theses.hal.science/tel-01996412>

Submitted on 28 Jan 2019

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 bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie - Santé

École Doctorale SICMA

présentée par

Nawal BELMADI

Préparée à l'INSERM UMR 1078

dans l'équipe " Thérapie Génique et
Transfert de Gènes"

Développement,
formulation et
biodistribution de vecteurs
synthétiques pour le
transfert de gènes dans le
cadre de la thérapie
génique de la
mucoviscidose

Thèse soutenue le 11 décembre 2015

devant le jury composé de :

Paul-Alain JAFFRES

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Examineur*

Tristan MONTIER

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Directeur de thèse*

Patrick MIDOUX

Directeur de recherche, CNRS UPR 4301 / *Rapporteur*

Loïc LEMIEGRE

MCU, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes CNRS
UMR 6226 / *Rapporteur*

Tony LE GALL

Chercheur, INSERM UMR 1078 / *Examineur*

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité INSERM 1078, à l'université de Bretagne Occidentale, et a été financé par la Région Bretagne et l'université de Bretagne Occidentale que je remercie.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Claude Férec pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie le Docteur Patrick Midoux et le Docteur Loïc Lemiègre de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je remercie le Professeur Pau-Alain Jaffrès et le docteur Tony Le Gall d'avoir accepté de participer à mon jury

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur le Professeur Tristan Montier, mon directeur de thèse. Il m'a accueilli au sein de son équipe « Thérapie Génique et Transfert de gènes » et encadré lors de ma thèse. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre aide et écoute durant ces trois années de thèse. Merci pour vos conseils et vos encouragements.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Pierre Lehn, auprès duquel j'ai appris beaucoup sur le transfert de gènes et la mucoviscidose. Vous m'avez beaucoup apporté aussi bien sur le plan humain que scientifique au cours de ces trois années de thèse. Recevez ici le témoignage de mon profond respect.

Merci également à toute l'équipe « Thérapie génique et Transfert de gènes » de l'UI078 : Yann Sibiril, Caroline Denis, Angélique Mottais, D^r. Tony Le Gall, D^r. Véronique Laurent, Nathalie Carmoy-Jézequel, D^r. Pauline Resnier, D^r. Frédérique d'Arbonneau, Charles-Henri David, ainsi que Tatiana Lobry. Merci à tous pour votre présence, votre aide et votre soutien.

Je tiens également à remercier particulièrement le Docteur Mathieu Berchel pour son aide précieuse durant ces années de thèse. Merci pour ton aide, ton écoute, tes conseils et encouragements qui m'ont été d'une aide précieuse.

Je tiens à associer à mes remerciements toute l'équipe « Phosphore et Vectorisation » du Professeur Paul-Alain Jaffrès pour tous les échanges que nous avons eus au cours de cette thèse. Ainsi, je remercie Paul-Alain Jaffrès, Jean-Pierre Healters, Hélène Couthon-Gourvès, Olivier Lozach, Stéphanie Le Corre, Wilfried Berthe, Sylvie Hernot, Damien Afonso et Mélissa Roger.

Je remercie également nos collaborateurs chimistes de Rennes, le Docteur Thierry Benvengnu et le Docteur Loïc Lemiègre.

Je tiens à remercier le Docteur Catherine Grillon et le Docteur Claudine Kieda qui m'ont encadré durant mon master. Merci pour tous ce que vous m'avez transmis sur le plan humain et scientifique. Merci pour vos précieux conseils. Catherine merci pour ta présence, ton écoute, ton aide et ton soutien que j'apprécie énormément. J'associe à mes remerciements l'ensemble de l'équipe « Reconnaissance Cellulaire et Glycobiologie » et le personnel du centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans. Merci pour tous les moments passés ensemble, ils resteront gravés à jamais dans ma mémoire.

Je remercie également l'ensemble du personnel de l'UI078 que j'ai pu côtoyer de près ou de loin. Je pense tout d'abord à Cécille Voisset pour son aide, ses conseils et les discussions riches et sympathiques qu'on a eus. Je pense également à Sophie Podeur avec qui j'ai eu de nombreux

échanges sympathiques. Je remercie également l'ensemble de l'équipe du D^r. Laurent Corcos et du D^r. Pascal trouvé pour leur sympathie. Je remercie chaleureusement Flaria El Khoury, Angélique Mottais, Marie-Laure Calvez, Florentin Huguet, Paul Buscaglia, Nathalie Benz.

Je remercie le personnel de l'animalerie particulièrement Marie – Françoise et Manu pour tous les échanges sympathiques que nous avons eus.

Je remercie particulièrement mes meilleures copines de l'enfance Athénia et Siham qui ont cru en moi et en mes capacités.

Merci à toi Flaria pour tous les moments partagés ensemble, depuis Orléans jusqu'à Brest. Qui sait peut être qu'on trouvera un post-doc dans la même ville, comme pour la thèse.

Je tiens à remercier du plus profond de mon cœur toute ma famille. Tout d'abord mes très chers parents, merci pour votre soutien sans faille, pour votre aide, présence et conseils qui m'ont été d'une aide précieuse. Merci d'avoir cru en moi, sans vous je ne serai pas là où je suis aujourd'hui. Merci pour votre confiance et votre amour, je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez et vous continuez à faire pour moi. Vous me manquez beaucoup. Tout simplement un grand **Merci**. Vous êtes tout ce que j'ai de plus précieux au monde, ce travail vous est dédié.

Je tiens à associer à mes remerciements mes très chers frères et sœurs ainsi que mes beaux-frères et belles-sœurs. Merci pour votre confiance en moi et pour vos encouragements. Votre soutien et votre présence sont très importants pour moi. Merci pour toute la tribune que vous nous avez donné, mes adorables neveux Belkacem, Zizou, Sofiane, Rayane, Cylia, Athéna et Melissa. Votre existence me comble de bonheur, et vos bêtises aussi.

À ma tante qui nous a quittés beaucoup trop tôt ...

Et puis toi Boudjema, tu as su m'accompagner et t'adapter à mon rythme de vie de doctorante, Merci

Table des matières

1	Introduction générale	1
	Chapitre I : La mucoviscidose	6
1	Généralités sur la mucoviscidose	6
2	Le gène CFTR	7
3	Les classes de mutations	8
4	La protéine CFTR	11
4.1	Structure de la protéine CFTR	11
4.1.1	Les domaines MSDs	11
4.1.2	Les domaines NBDs	12
4.1.3	Le domaine R	12
4.2	Expression de la protéine CFTR	15
4.3	Fonctions de la protéine CFTR	15
5	Physiopathologie de la maladie	18
5.1	Atteintes respiratoires	18
5.2	Autres atteintes	19
5.2.1	Atteintes intestinales	19
5.2.2	Atteintes pancréatiques	20
5.2.3	Atteintes hépatobiliaires	20
5.2.4	Atteintes génitales	20
6	Diagnostic et dépistage	20
6.1	Diagnostic	20
6.2	Dépistage	21
6.2.1	Dépistage néonatal	21
6.2.2	Dépistage prénatal	21
7	Traitements de la mucoviscidose et prise en charge	21
7.1	Traitements symptomatiques	22
7.2	Thérapie pharmacologique de la protéine	23
7.2.1	Correction des mutations de classe I	23
7.2.2	Correction des mutations de classe II	24
7.2.3	Correction des mutations de classe III et IV	25
7.3	Thérapie génique	30
8	Le système respiratoire	31
8.1	Anatomie et fonctions du système respiratoire	31
8.2	Composition de l'épithélium respiratoire	33

8.3	Les cellules cibles de la thérapie génique	38
Chapitre II : La thérapie génique		40
1	Principe de la thérapie génique.....	40
2	Stratégies et approches de la thérapie génique.....	41
2.1	Approche <i>ex vivo</i>	41
2.2	Approche <i>in vivo</i>	42
3	Pathologies ciblées	44
4	Moyens de transfert de gènes	46
4.1	Les approches virales.....	47
4.1.1	Les adénovirus.....	47
4.1.2	Les adénovirus associés.....	48
4.1.3	Les rétrovirus.....	51
4.1.4	Les lentivirus	52
4.1.5	Conclusion.....	53
4.2	Les approches non virales	54
4.2.1	Approches physiques.....	54
4.2.2	Approches chimiques	58
5	Importance de la séquence d'acide nucléique.....	79
Chapitre III : Biodistribution		80
1	Généralités	80
2	Système circulatoire.....	80
2.1	Structure des parois vasculaires.....	81
2.2	Le sang.....	82
3	Voies d'administration	84
3.1	Voie systémique	84
3.2	Voie locale pulmonaire.....	85
4	Barrières intra et extracellulaires.....	85
4.1	Barrières extracellulaires selon le mode d'administration	86
4.1.1	Voie systémique	86
4.1.2	Voie pulmonaire	89
4.2	Barrières intracellulaires	95
4.2.1	L'endocytose des complexes.....	97
4.2.2	L'échappement endosomal.....	101
4.2.3	Routage intracellulaire et Import nucléaire	104
4.2.4	L'expression du transgène.....	107

Revue bibliographique	108
Chapitre IV : Partie Expérimentale	131
1 Formulation des lipides cationiques.....	131
2 Plasmide	133
3 Complexation d'ADN	134
4 Évaluation sur modèles cellulaires	135
4.1 Lignées cellulaires.....	135
4.2 Préparation des complexes	135
4.3 Transfection cellulaire	135
4.4 Révélation de l'expression du transgène	136
4.4.1 Lyse cellulaire	136
4.4.2 Dosage de l'activité luciférase.....	136
4.4.3 Dosage des protéines totales.....	137
4.5 Évaluation de la cytotoxicité	137
5 Transfection <i>in vivo</i>	138
5.1 Préparation des complexes	138
5.2 Administration systémique	139
5.3 Suivi des complexes <i>in vivo</i> par biofluorescence	139
5.4 Quantification de l'expression du transgène par bioluminescence.....	139
5.5 Biofluorescence sur organes isolés	140
5.6 Analyse de l'atteinte hépatique	140
Chapitre V : Résultats	142
1 Évaluation de nouveaux lipophosphoramidates fluorescents pour le transfert de gènes et études de biodistribution <i>in vivo</i> après administration systémique	142
2 Évaluation de nouveaux lipophosphoramidates comportant chaînes lipidiques différentes pour le transfert de gènes	168
3 Évaluation de lipophosphates cationiques, une nouvelle famille de lipides cationiques pour le transfert de gènes.....	181
Discussion – Conclusions et Perspectives	193
Références bibliographiques	200

Liste des abréviations

ABC : ATP Binding Cassette
ABPA : Allergic Broncho Pulmonary Aspergillosis
aGM1 : Asialoganglioside 1
AON : Antisense OligoNucleotide
apo E : apolipoprotéine E
BGTC : Bis (guanidinium)-tren-cholestérol
BMDMSC : Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell
BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
BSV : Brest Synthetic Vector
CaCC : Ca²⁺ activated Cl⁻ Chanel
cAMP : Adénine monophosphate cyclique
CAP : Channel- Activating Protease
CAR : Coxsackie and Adenovirus Receptor
CF : Cystic Fibrosis
CFBE : Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial cells
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHMP : Comité des médicaments à usage humain
CHO : Chinese Hamster Ovary
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : Cytomégalovirus
COS-7 : Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40
CR : Rapport de charge (Charge Ratio)
CRISPR/Cas9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 nucleases
CTLs : Cytotoxic lymphocytes T
DC-Chol : [3-β-N-N', N' diméthylaminoéthane)-carbamoyle]-cholestérol
DDP : Différence de potentiel transépithéliale
DMAAPS : N,N-diméthyl(acrylamidopropyle) ammonium propane sulfonate
BMB : Dystrophie Musculaire de Becker
DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne
DMRIE : N-(2-hydroxyéthyle)-N,N-diméthyl-2,3-bis(tétradécyleoxy-1propanaminiumbromide)
DOGS : Dioctadécylamine-Glycine-Spermine
DOPC : Dioléoyl phosphatidyl choline
DOPE : Dioleoyl phosphatidyléthanolamine
DORIE : 1,2-dioleoyloxypropyle-3- diméthylhydroxyéthylammonium bromide
DOSPA : 2,3-dioleoyloxy-N-[2-(spermine-carboxamido)éthyle]-N,N-diméthyl-1-propanammonium trifluoroacetate
DOTAP : méthylsulfate de N-[1-(2,3 dioleoyloxy) propyle]-(N, N, N triméthyle ammonium)
DOTMA : Chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyle]-N,N,N-Triméthyle ammonium
DTS : DNA Nuclear Targeting sequences
EGF : Facteur de Croissance Epidermique
EGTA : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ENaC : Epithelial Na⁺ Channel
EPR : Epithélium Pigmentaire Rétinien

FDA: Food and Drug Administration
FEV1 : Forced Expiratory Volume in 1 second
FIP-1 : Fourteen.7K Interacting Protein 1
FVC : Forced Vital Capacity
GL62 : N1-spermine cholesterylcarbamate
GL67 : N4-spermine cholesterylcarbamate
HA: Hémagglutinine du virus influenza
16HBE : Human bronchial Epithelial Cells
hCEFI : human Cellular Elongation Factor I
HDL : High Density Lipoprotein
H_I : Phase Hexagonale normale
H_{II}^C : Phase Hexagonale inverse
His : Histidine
HIV : Human Immunodeficiency Virus
HLV : Hydrodynamic Injection saphenous Vein
HSPG: Heparan Sulfate Proteo Glycan
HSV/tk : Herpes Simplex Virus / thymidine kinase
IP₃ : Inositol Triphosphate
ITR : Inverted Terminal Repeat Sequences
IV : Injection intraveineuse
KLN47 : Karine Le Ny
LDL : Low Density Lipoprotein
LPD : Lysophosphatidylcholine
IPEI : Polyéthylèneimine linéaire
LTR : Long Terminal Repeat Sequences
MARCO : Macrophage Receptor with Collagenous Structure
MCF7 : Michigan Cancer Foundation – 7
Mo-MLV: Moloney Virus - Murine Leukemia Virus
MPS : Mononuclear Phagocyte system
MSC : Mesenchymal Stem Cells
MSD : Membrane Spanning Domain
NBD : Nucleotide Binding Domain
NDP : Nasal Potential Difference
NLS: Nuclear Localization Signal
NPC : Nuclear Pore Complex
ODN : Oligonucléotides
ORCC : Outwardly Rectifying Chloride Channel
4PBA : Sodium 4 -phenylbutarate
PC3 : Human prostate cancer
PEG: Polyéthylène glycol
PEI : Polyéthylèneimine
PG : Polyglycérol
γ-PGA : acide γ polyglutamique
PIP₂ : Phosphatidyl inositol diphosphate
PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine kinase C
PLL : Poly-L-lysine
PM : Poids Moléculaire
PTC124 : Premature Termination Codon
rAAV : recombinant Adeno-Associated Virus
rAd : adénovirus recombinant
RD : Regulatory Domain
RGD : Arginine-Glycine-Acide Aspartique
ROMK : Renal Outer Medullary Potassium Channel
SAINT : Synthetic Amphiphile INTeraction
SCNT : Somatic Cell Nuclear Transfer
sgk1 : serum-glucocorticoid-kinase 1
SIV : Simian Immunodeficiency Virus
SPIONS : nanoparticules supramagnétiques d'oxyde de fer
SV40 : Simien Virus 40
TALENs : Transcription Activator-Like Effector Nuclease
TIR : Trypsine ImmunoRéactive
TK : Thymidine Kinase
TLR : Toll Like Receptor
TM : Transmembrane helix
VSVG : vesicular stomatitis virus G
WT : Wild-type
ZFNs : Zinc-Finger Nucleases

1 Introduction générale

L'ADN est le support de l'information génétique. Sa structure chimique en double hélice a été mise en évidence par Francis Crick, Jim Watson et Maurice Wilkins, il y a un demi-siècle [1]. Cette découverte révolutionna la Science et marqua la naissance d'une nouvelle discipline; la biologie moléculaire. Cette dernière a connu d'énormes progrès à partir des années 1970, notamment par la découverte des enzymes de restriction, des techniques de clonage, et d'amplification moléculaire conduisant ainsi au séquençage du génome humain [2]. De nouvelles pistes thérapeutiques ont ainsi émergées avec, parmi elles la thérapie génique apparue dans les années 70 [3].

La thérapie génique consiste à utiliser des séquences d'acides nucléiques à des fins thérapeutiques. Le principe consiste selon la pathologie visée, à délivrer aux cellules un gène fonctionnel pour remplacer celui muté ou dysfonctionnel à l'origine de la maladie, soit un gène capable de réguler ou d'inhiber l'expression des gènes altérés [4]. À la différence d'un médicament qui agit sur l'activité des protéines et sur les fonctions cellulaires, la thérapie génique cherche à intervenir plus en amont, à la source même du dysfonctionnement. Initialement elle a été décrite pour les maladies monogéniques dont le gène responsable avait été identifié, telles que la mucoviscidose, les déficits immunitaires sévères,...etc, puis ses applications ont été étendues à un plus large éventail de pathologies comme les cancers, les maladies neurodégénératives, le diabète, ...etc. Les champs d'application de la thérapie génique sont aujourd'hui nombreux et se distinguent principalement sous deux formes selon le type de cellules à corriger. D'une part, la thérapie génique somatique qui consiste en un transfert de gènes dans les cellules somatiques du patient afin de corriger une anomalie, sans que la correction ne soit transmise à la descendance. D'autre part, la thérapie génique germinale qui consiste en la modification du patrimoine génétique des cellules sexuelles, dont la correction est transmissible aux futures générations. Cette deuxième forme d'approches est totalement interdite chez l'Homme en raison des considérations notamment éthiques.

La délivrance des gènes médicaments dans les cellules nécessite un système de transfert sûr et efficace, appelé « vecteur ». Ce dernier doit être capable de compacter l'ADN, de masquer sa charge et de le protéger des dégradations par les nucléases qu'il peut subir dans les milieux biologiques. En effet, le succès du transfert de gènes est largement dépendant du comportement du vecteur au cours de son trajet, du site de l'injection jusqu'au noyau. C'est pourquoi le vecteur idéale doit avoir un certain nombre de caractéristiques, qui sont principalement, (i) une bonne efficacité de transfection avec le moins d'effets secondaires

Introduction Générale

possible, c'est-à-dire être capable d'induire une expression du gène d'intérêt à un niveau suffisant pour avoir un effet thérapeutique clinique ou bien de bloquer la traduction des protéines spécifiques à l'origine du dysfonctionnement pathologique, (ii) en plus être spécifique du tissu cible et non immunogène [5,6]. Les méthodes de thérapie génique sont essentiellement classées en deux catégories : la délivrance par les virus recombinants, et par les approches chimiques et physiques qualifiées de « non virales ». En fonction du type de la maladie, la thérapie génique utilise divers outils pour la délivrance de gènes, principalement les virus, les vecteurs synthétiques, les oligonucléotides, les siRNA, l'ADN nu, les ribozymes,...etc [4]. Les vecteurs viraux sont les plus utilisés en raison de leur capacité naturelle à reprogrammer leur hôte par transfert de gènes. En effet, les virus sont des vecteurs naturels, ayant pour caractéristique essentielle l'accès au noyau des cellules hôtes pour y transférer leur matériel génétique et d'utiliser la machinerie cellulaire pour se répliquer et se disséminer dans l'organisme. De nombreux virus modifiés (renferment un génome recombinant porteur du gène thérapeutique) sont couramment utilisés dans la majorité des essais cliniques en raison de leur efficacité de transfection très élevée par rapport aux vecteurs non viraux [7,8]. Ainsi les virus recombinants restent la référence à ce jour. Les plus utilisés sont principalement les rétrovirus, lentivirus, adénovirus, virus associés aux adénovirus (AAV) et le virus de l'herpès, qui sont modifiés de façon à éviter qu'ils ne se multiplient au sein des cellules infectées. La modification des virus consiste à amputer les séquences virales qui codent pour les protéines essentielles au cycle infectieux pathogène. Seules les séquences permettant la construction de la particule virale et d'assurer le cycle d'infection sont conservées. Le génome du virus est enfin remplacé par celui du gène thérapeutique d'intérêt. Mais les nombreux problèmes posés par l'emploi de virus recombinants (coût de production, immunogénicité,...) ont poussé les chercheurs à développer d'autres systèmes de délivrance de gènes capables d'assurer les mêmes fonctions que les virus, mais sans leurs inconvénients. Ainsi d'autres approches ont émergées essentiellement les méthodes physiques (l'électroporation, la magnétofection,...) et chimiques (les lipides et polymères cationiques, les peptides,...). Étant donné que les méthodes physiques de transfert de gènes sont peu efficaces et difficilement applicables aux organes profonds, les recherches se sont concentrées sur le développement des vecteurs synthétiques. Ces derniers sont donc des molécules synthétiques d'inspiration naturelles, essentiellement des lipides cationiques, des polymères cationiques et des peptides, capables d'interagir par effet électrostatique avec les phosphates anioniques de l'ADN, et de le compacter pour engendrer des particules appelées respectivement lipoplexes ou polyplexes. Les évaluations précliniques montrent que les

Introduction Générale

vecteurs synthétiques ont une efficacité limitée, mais suscitent un intérêt lié principalement à leur innocuité, par rapport aux virus recombinants [8].

De nombreuses barrières s'opposent à la délivrance et à l'expression d'un gène d'intérêt à un endroit voulu de l'organisme, citons: les interactions avec les composants du sang telles que les protéines sériques (ex. albumine,...), les risques d'opsonisation par les cellules du système immunitaire, le mucus des voies respiratoires, les infections bactériennes opportunistes et l'inflammation chronique associée. Ce qui peut en effet expliquer la faible efficacité de transfection des vecteurs synthétiques. La composition, la taille, la forme des molécules ont un impact important sur la biodistribution et le devenir des médicaments dans l'organisme [6]. En effet, les particules chargées positivement interagissent avec les protéines sériques et sont reconnues facilement par les cellules du système immunitaire, conduisant à la déstabilisation et à la clairance rapide des complexes. La dissimulation de la charge de surface des nanoparticules est donc essentielle lors d'une administration systémique. Ainsi, l'utilisation du gène comme médicament implique la connaissance et la compréhension des nombreux processus qui régissent la pharmacologie, la biodistribution, et l'expression du principe actif dans les cellules (formulation, mode d'administration, cible thérapeutique). L'étude de ces mécanismes est nécessaire pour permettre l'amélioration des systèmes de délivrance de gènes et par conséquent, leur efficacité de transfection aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. L'objectif de ces études est de prolonger la biodisponibilité des médicaments dans l'organisme pour en accroître leur efficacité, et aussi les capacités de ciblage, tout en réduisant les effets secondaires (toxicité hépatique et réponse inflammatoire) en fonction de la voie d'administration. Afin de contourner ces nombreuses barrières, plusieurs chercheurs se sont intéressés à la question et plusieurs hypothèses ont été étudiées. La vectorisation a ainsi considérablement évolué au cours des dernières années. Ainsi, les acides nucléiques qui d'abord étaient utilisés seuls ont été incorporés dans différents systèmes tels que les virus recombinants, les vecteurs synthétiques dans le but d'améliorer leur efficacité de transfection. Par la suite, une variété de composés avec des caractéristiques physicochimiques et biologiques différentes tels que le polyéthylène glycol (PEG) (furtivité) [9,10], les motifs imidazoles [6,11,12], DOPE (Dioleoyl Phosphatidyléthanolamine) (fusogénicité) [12,13] ont été ajoutés aux formulations pour apporter de nouvelles propriétés, comme par exemple augmenter la furtivité, protéger l'ADN contre les attaques du système immunitaire, favoriser l'échappement endosomal pour un but final qui est l'amélioration de l'efficacité de transfection et la limitation des effets indésirables. Des ligands peuvent être aussi ajoutés afin d'augmenter le ciblage cellulaire [6]. Pour favoriser l'entrée dans le noyau, des séquences

Introduction Générale

spécifiques d'ADN reconnues par certains facteurs de transcription, comme NFκB ont été insérées dans les plasmides [14,15]. Également, la présence de la séquence codante pour le peptide P79-98 de la protéine E3-14.7K de l'adénovirus humain dans la construction plasmidique, facilite l'interaction entre les microtubules et l'ADNp dans les lignées cellulaires, et ainsi améliore considérablement les propriétés transfectantes des polyplexes [16]. E3-14.7K est une protéine précoce d'adénovirus humains qui interagit via la protéine FIP-1 (Fourteen.7K Interacting Protein 1) avec les composants à chaîne légère de la protéine motrice dynéine humaine des microtubules [16]. D'autres stratégies ont été développées [6], et seront détaillées dans le manuscrit.

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai travaillé sous la direction du Pr. Tristan MONTIER sur l'utilisation de lipides cationiques développés par l'équipe du Pr. Paul-Alain Jaffrès de l'UMR CNRS 6521 de Brest, dans le but de développer et de mettre au point de nouvelles molécules synthétiques pour le transfert de gènes dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose. Mes travaux de thèse ont donc porté sur l'étude de la biodistribution in vivo de lipophosphoramidates fluorescents après administration systémique. L'objectif de l'étude est l'optimisation structurale des composés afin de mieux contourner les barrières biologiques auxquelles sont confrontés les vecteurs synthétiques selon la voie d'administration. J'ai également participé à l'évaluation de l'efficacité de transfection d'autres composés synthétiques, principalement sur modèles cellulaires. Les détails et objectifs de ces travaux seront décrits dans le chapitre V : Résultats.

Ainsi, après une courte introduction du projet, nous parlerons en détail de la pathologie de mucoviscidose, en développant davantage la physiopathologie de la maladie, les mécanismes impliqués, les méthodes de diagnostic et les traitements qui existent à l'heure actuelle. Par la suite, nous aborderons la thérapie génique et ses différentes applications, en s'intéressant davantage aux vecteurs synthétiques. Un chapitre également est consacré à la biodistribution et aux barrières biologiques qui s'opposent au transfert de gènes selon les voies d'administration. Dans la partie expérimentale, nous parlerons d'abord de l'utilisation de sondes fluorescentes lipidiques pour marquer et suivre les lipophosphoramidates lors des études de biodistribution in vivo. Ensuite, nous aborderons l'insertion soit de deux chaînes grasses différentes dans un même composé pour former des lipides cationiques asymétriques, soit deux chaînes lipidiques identiques pour former des composés symétriques [17]. Le but est d'étudier l'impact de la partie grasse sur les caractéristiques physicochimiques et sur les propriétés transfectantes des lipides cationiques. L'efficacité de transfection de composés originaux caractérisés par un espaceur de type aryle a été évaluée [18]. Différentes têtes

Introduction Générale

cationiques portant soit une charge cationique, soit deux charges cationiques ont été utilisées et l'efficacité de transfection des différentes molécules produites a été évaluée sur modèles cellulaires [18]. (Les résultats obtenus sont détaillés dans le chapitre V : Résultats).

Chapitre I : La mucoviscidose

1 Généralités sur la mucoviscidose

La mucoviscidose, appelée Cystic Fibrosis (CF) en anglais est une maladie monogénique, autosomique et récessive. C'est la plus répandue des maladies monogéniques héréditaires dans les populations caucasiennes européennes et nord – américaines [19]. Actuellement, cette maladie cause principalement des atteintes respiratoires. Si l'espérance de vie des malades a été largement améliorée (25 à 30 ans en moyenne) [20], par une meilleure prise en charge et des traitements symptomatiques mieux adaptés, la mucoviscidose reste cependant une maladie mortelle pour laquelle aucun traitement curatif n'est actuellement disponible, hormis la greffe cœur-poumons qui n'est pas sans risque à court et à moyen termes.

En France, son incidence est estimée à 1 naissance tous les 3 jours, et environ 2 millions de personnes sont porteuses saines du gène responsable de la maladie [21,22]. En 2012, les centres participants au registre français de la mucoviscidose ont recensés environ 7000 patients atteints de la pathologie, avec une couverture de la population des patients estimée à 90% environ [21]. La répartition géographique des patients montre une disparité entre les régions et département. En Bretagne, 1 nouveau – né sur 2000 environ est atteint [23].

La mucoviscidose a été décrite initialement dans les années 1936 par le pédiatre suisse Guido Fanconi [24]. La première description complète de la mucoviscidose a été fournie par Dorothy Hansine Anderson en 1938, qui a introduit le terme de « Fibrose kystique du pancréas » en raison de la fréquence des atteintes pancréatiques associées [25]. Par la suite, la mise en évidence du mucus visqueux obstruant les voies respiratoires et intestinales a finalement amené à rebaptiser ce syndrome en France sous le nom de « mucoviscidose » [26]. Le caractère héréditaire et le mode de transmission récessif de la pathologie furent suggérés en 1945, par Dorothy Hansine Anderson et Hodges [27]. En 1953, Paul di Sant'Agnese a mis en évidence une perte excessive de sel dans la sueur des enfants atteints de mucoviscidose due à des anomalies électrolytiques [28], une observation clinique qui a mené peu de temps après, à la mise au point d'un test de diagnostic spécifique de la maladie dit «test de la sueur », encore aujourd'hui très utilisé [29–31]. Le principe du test repose sur la mesure de la quantité de sel dans la sueur. La concentration normale est < 30 mmol/L. Au-delà de 60 mmol/L le diagnostic de la mucoviscidose est confirmé. Dans les années 80, des anomalies de transport des ions chlorures (Cl⁻) furent mises en évidence au niveau des glandes sudoripares par Paul Quinton [32], et de l'épithélium respiratoire par Michael Knowles et Richard Boucher [33–36].

Chapitre I : La mucoviscidose

La mucoviscidose est le résultat des mutations survenant au niveau du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), identifié puis cloné en 1989 par les équipes de Francis Collins, Jack Riordan et Lap-Chee Tsui [25,37–41]. La découverte du gène en cause a permis d'envisager le traitement de cette maladie par thérapie génique. Elle consisterait donc dans ce contexte à transférer une version normale du gène CFTR dans les cellules atteintes afin de permettre la synthèse d'une protéine CFTR fonctionnelle.

2 Le gène CFTR

Le gène CFTR responsable de la mucoviscidose est situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31.2) (Figure 1A), a une taille de 230 kb et comporte 27 exons (Figure 1B) [25,37–39,42,43]. Il est transcrit en ARNm de 6,1Kb, dont la partie codante est de 4,4Kb. Le promoteur CFTR a été caractérisé comme un promoteur de type "gène de ménage" ou "**housekeeping**", et ne semble pas contenir les éléments régulateurs nécessaires à une expression cellule ou tissu spécifique [42,44,45]. Dépourvu de boîte « TATA », il contient une région riche en CG (65%) entre les positions 132 et 724 pb [42]. Ceci indique que la régulation cellulaire de l'expression variée du gène CFTR est susceptible d'être une fonction complexe de plusieurs voies de régulation qui se chevauchent [45]. Il code une protéine CFTR de 1480 acides aminés, et de poids moléculaire (PM) de 170 kDa [46], dont la fonction principale est celle d'un canal ionique permettant la sortie des ions Cl^- au niveau des cellules épithéliales exocrines, et contrôle les fonctions de d'autres canaux ioniques permettant le transport des cations Na^+ et K^+ (Figure 5). Ce canal est fortement exprimé dans les cellules épithéliales sécrétrices de l'intestin grêle, du pancréas, du système respiratoire et reproducteur, des glandes sudoripares et de certains autres sites [47–51], ce qui explique les canalopathies des tissus épithéliaux.

Plus de 2001 mutations du gène ont déjà été décrites à ce jour [52]. La plus répandue est la mutation F508del (ΔF508), qui correspond à une délétion d'une phénylalanine en position 508 [22,50,51,53]. Cette mutation se retrouve dans plus de 70% des personnes [22]. D'autres grandes délétions ont également été identifiées, tels que les délétions simples d'un ou plusieurs exons [54], ou des délétions complexes impliquant des insertions de séquence génomique inversée [55]. La majorité des mutations à l'origine de la pathologie sont des mutations ponctuelles [56]. D'autres mutations de type faux - sens, micro - délétions, micro - insertions, et non - sens ont également été décrites. Cependant, seules quelques-unes de ces mutations sont retrouvées chez plus de 1% des patients.

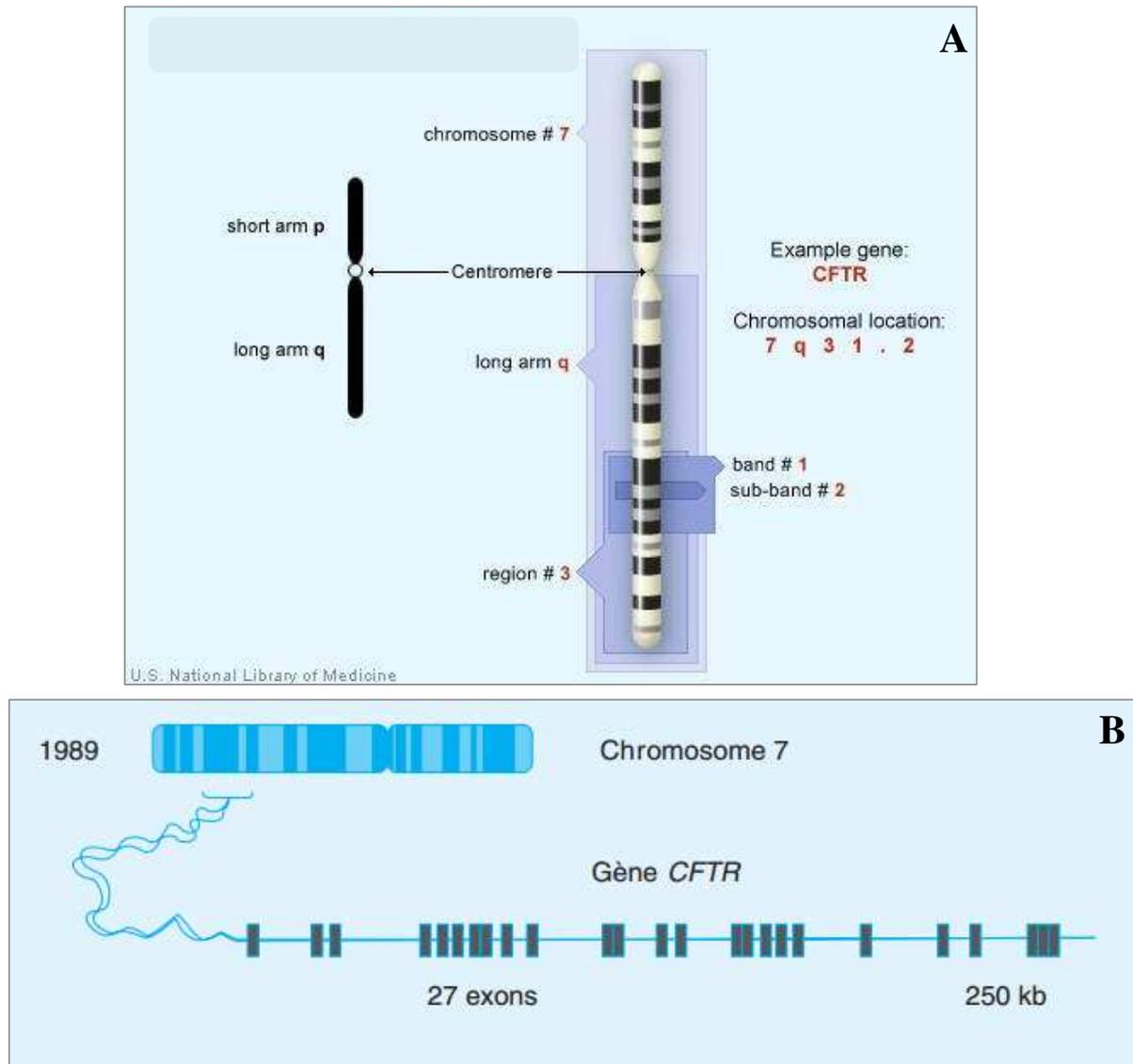


Figure 1: Représentation schématique de la localisation (A) et de la structure (B) du gène CFTR (modifiées d'après [57,58]).

3 Les classes de mutations

Des mutations dans le gène CFTR entraînent des anomalies structurelles de la protéine et par voie de conséquence, une perturbation de l'activité du canal à chlorures et un défaut de régulation des autres canaux ioniques au niveau des membranes apicales des cellules épithéliales. Ceci entraîne un dérèglement de l'homéostasie ionique du fluide périciliaire, la formation par déshydratation d'un mucus hypervisqueux qui engendre des obstructions des voies respiratoires et des occlusions intestinales.

Les principales mutations du gène CFTR peuvent être regroupées en six classes, selon leurs conséquences fonctionnelles (Figure 2) [40,58,59].

Chapitre I : La mucoviscidose

Classe I: les mutations de classe I entraînent un défaut de synthèse du CFTR. Elle regroupe les mutations non – sens, les micro – délétions ou micro – insertions produisant un décalage du cadre de lecture et introduisant ainsi un codon stop prématuré altérant par conséquence, le processus de synthèse de la protéine CFTR. Les principales mutations de cette classe sont les mutations G542X, R553X et W1282X. Celles-ci entraînent l'apparition d'un codon stop prématuré, donnant lieu à un ARNm instable qui sera rapidement dégradé. La conséquence moléculaire de ces mutations est l'absence totale de la protéine CFTR.

Classe II: cette classe regroupe les mutations altérant les processus de maturation et / ou du trafic intracellulaire de la protéine CFTR, affectant ainsi l'adressage de la protéine à la membrane. Comme nombre de protéines membranaires, la protéine CFTR est glycosylée ; ainsi sa biosynthèse implique un passage par le réticulum endoplasmique où s'effectuent son repliement et le début de la N-glycosylation, puis par l'appareil de Golgi où se fait la maturation post-traductionnelle en particulier la glycosylation, avant d'être finalement adressée à la membrane. Étant mal conformées, les protéines sont reconnues par le système de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique et sont donc dégradées peu après leur synthèse par le protéasome. Elles ne sont donc pas acheminées à la membrane. La mutation type de cette classe est la $\Delta F508$, interférant directement avec le repliement et la maturation de la protéine CFTR et conduisant à une perte de fonction au niveau de la membrane plasmique [53]. Les essais de modélisation de la structure en 3D ont montré que la phénylalanine 508 était localisée à la surface du domaine NBD1 (Nucleotide Binding Domain 1). Ceci suggère que la mutation $\Delta F508$ n'affecte pas le repliement global du domaine NBD1. Par contre, des effets sur la cinétique du repliement, la stabilité et les caractéristiques dynamiques du domaine NBD1 ont été observés [60,61]. Des travaux récents ont démontré que la délétion $\Delta F508$ au niveau du domaine NBD1 conduit à une augmentation des changements conformationnels et inhibe le processus de dimérisation des domaines NBDs [62]. Les altérations dues à l'absence du résidu F508 ainsi qu'aux modifications autour de la mutation de la surface du NBD1 du CFTR- $\Delta F508$ conduisent à un défaut d'assemblage des domaines de la protéine CFTR [62,63].

Classe III: les mutants de classe III sont principalement des mutations faux – sens siégeant au niveau des sites de liaison à l'ATP, ce qui altère la régulation du canal chlore CFTR. En effet, les protéines produites sont correctement adressées à la membrane, mais elles y présentent un défaut de régulation [64]. L'exemple type est le mutant G551D situé dans le domaine NBD1.

Chapitre I : La mucoviscidose

Classe IV: ces mutations sont essentiellement des faux – sens localisées dans les domaines transmembranaires impliqués dans la formation du canal ionique. La protéine est correctement adressée et positionnée à la membrane, mais la conduction (diminution du flux d'ions) et la sélectivité ionique du canal chlore sont perturbées. Les mutants R117H et R334W font partis de cette classe.

Classe V: cette classe est caractérisée par un déficit quantitatif de transcrits CFTR. Ce sont des mutations qui affectent le promoteur du gène CFTR et l'épissage des transcrits. Ces mutations sont associées à des phénotypes moins sévères que les précédentes.

Classe VI: cette catégorie comprend les mutations qui sont à l'origine d'une protéine CFTR tronquée au niveau du domaine C-terminal. Ceci conduit à une diminution de la stabilité de la protéine une fois localisée à la membrane [65], mais également à une hyperabsorption des ions sodium au niveau du canal ENaC (Epithelial Na⁺ Channel) et à une régulation altérée des canaux ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel), et ROMK (Renal Outer Medullary Potassium Channel), permettant le transport des ions Cl⁻ et K⁺ respectivement [58,66]. La mutation F508del lorsqu'elle est restaurée à la surface cellulaire (rF508del) se comporte comme un mutant de classe VI en raison de son instabilité intrinsèque [67,68].

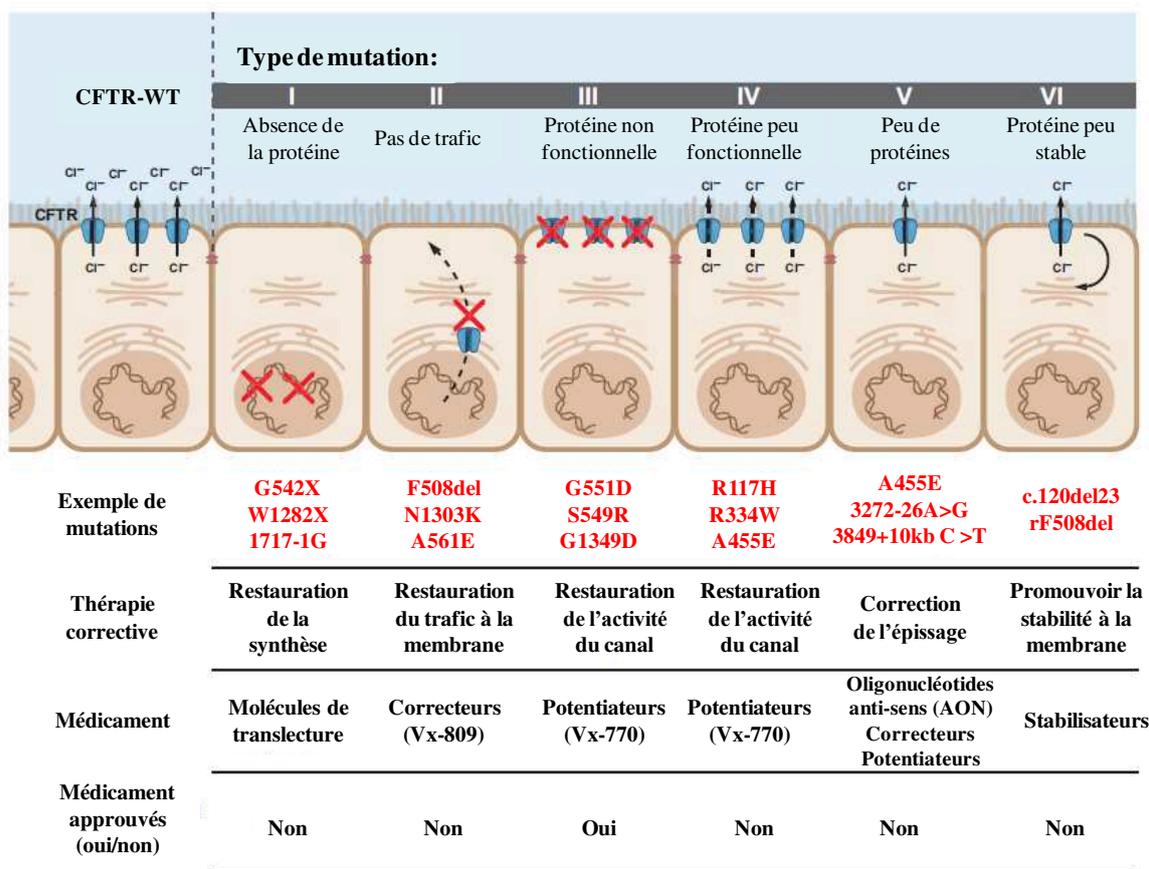


Figure 2: Classes de mutations du gène CFTR et leurs conséquences moléculaires (modifiée d'après [69]). Les stratégies et molécules thérapeutiques développées ainsi que leurs statuts cliniques actuels sont indiqués ici. WT : Wild-type, AON : Antisense OligoNucleotide.

4 La protéine CFTR

La protéine CFTR est une glycoprotéine transmembranaire de 1480 acides aminés, et de 170 kDa environ pour la forme mature. Elle appartient à la famille des protéines ABC (ATP Binding Cassette) [70], impliquées dans le transport transmembranaire ATP-dépendant de diverses molécules telles que les ions, les peptides, les acides aminés et le cholestérol [71,72].

4.1 Structure de la protéine CFTR

La protéine CFTR comporte 5 domaines (Figure 3); deux domaines NBD (Nucleotide Binding Domain), deux domaines MSD (Membrane Spanning Domain) et un domaine régulateur R [46].

4.1.1 Les domaines MSDs

L'assemblage des domaines MSDs formés chacun de six hélices transmembranaires (nommées TM1 à TM12) forme un canal ionique chlore dont l'activité est régulée par les domaines intracellulaires de CFTR (domaines de liaison à l'ATP, domaine régulateur et

Chapitre I : La mucoviscidose

extrémités N et C – terminales). Les hélices transmembranaires du second MSD (TM6 et TM12) jouent un rôle majeur dans la formation du canal ionique. En effet, selon diverses études expérimentales l'hélice TM6 est impliquée dans les propriétés de conductance du canal CFTR [73–78]. De façon moins marquée, l'hélice TM12 est également impliquée [79]. Ces observations suggèrent que les deux hélices transmembranaires 6 et 12 de structure équivalente contribuent de manière asymétrique à la régulation des propriétés du canal CFTR [79].

4.1.2 Les domaines NBDs

Les domaines NBD1 et NBD2 forment un hétérodimère tête – bêche, à l'interface duquel se trouvent les sites de liaison de l'ATP dits Walker A et Walker B [80,81]. Ces domaines régulent l'activité du canal CFTR, et c'est essentiellement l'hydrolyse de l'ATP au niveau du site NBD2 qui dirige les mécanismes d'ouverture et fermeture du canal [82].

4.1.3 Le domaine R

Le domaine R de structure intrinsèquement désordonnée [83,84], régule l'activité du canal CFTR par l'intermédiaire d'interactions établies avec les autres domaines de la protéine [85,86]. La phosphorylation du domaine R est déterminante pour la dimérisation des domaines NBDs et ainsi pour l'ouverture du canal [37,87,88]. Il a été suggéré que l'absence de phosphorylation du domaine R ait pour conséquence une activité inhibitrice vis-à-vis du canal [89]. La phosphorylation du domaine R est essentiellement assurée par la protéine kinase A (PKA), mais d'autres kinases, comme la PKC interviennent également dans le processus [83]. Le domaine R comporte deux sous domaines appelés respectivement RD1 (résidus 590-672) et RD2 (résidus 672-831) pour Regulatory Domain. Le sous domaine 1 est impliqué dans le processus de maturation de la protéine, et dans l'ouverture du canal via des interactions entre les sites de phosphorylation du domaine R et le domaine NBD1 [90]. Le sous domaine RD2 quant à lui constitue l'entité fonctionnelle du domaine R, du fait qu'il contient la majorité des sites phosphorylables (résidus de sérine) [91]. Le domaine R contient plusieurs sites de phosphorylation. Cinq principaux sites de phosphorylation ont été identifiés (S660, S700, S737, S795 et S813) [92], et la phosphorylation de la plupart de ces sites a un effet activateur, mais des effets inhibiteurs ont également été observés (S737 et S768) [93].

Chapitre I : La mucoviscidose

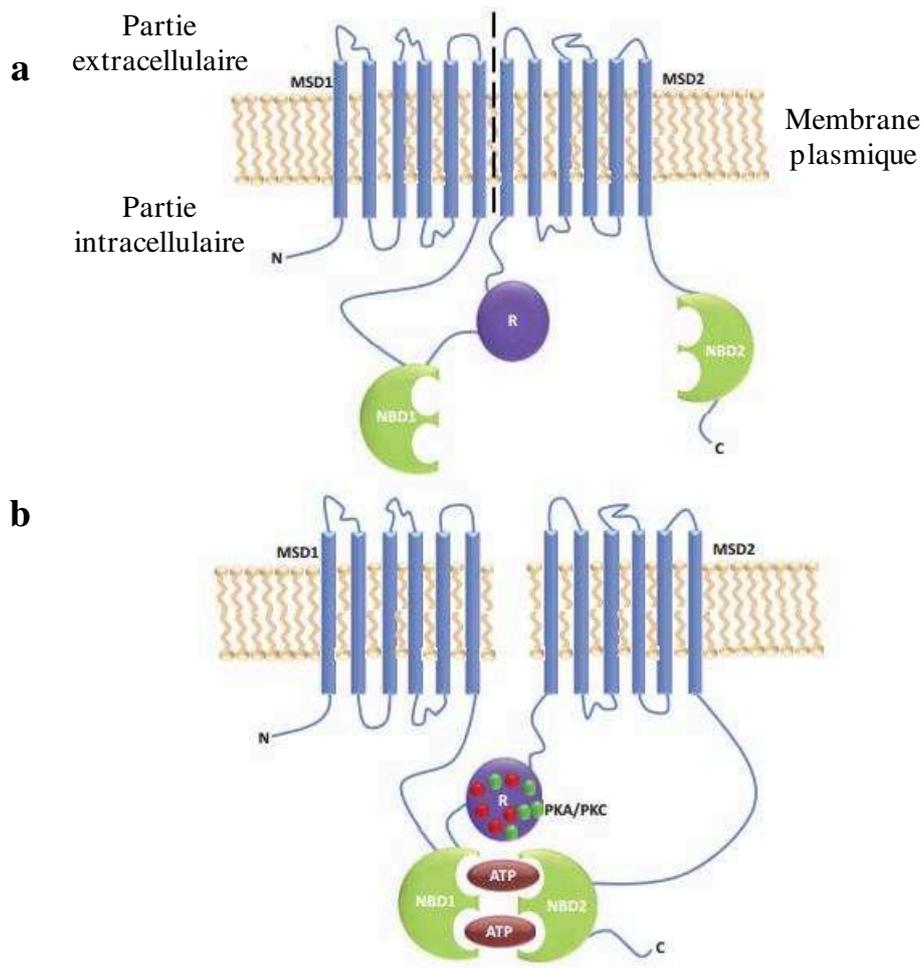


Figure 3: Modèle simplifié de la structure de la protéine CFTR (modifiée d'après [94]). **NBD**; Nucleotide Binding Domain, **MSD**; Membrane Spanning Domain, **R**; domaine Régulateur. À l'état de repos, les domaines NBDs sont dissociés et n'interagissent pas avec le domaine R, le canal CFTR est donc « fermé » (a). Lorsque le domaine régulateur R est phosphorylé par les protéines kinases intracellulaires AMPc – Dépendantes A et C (PKA et PKC), l'affinité de liaison d'ATP aux domaines NBDs augmente. La liaison de l'ATP aux domaines NBDs induit la dimérisation de NBD1 et NBD2. Cela se traduit par un changement de conformation, conduisant à l'ouverture du canal ionique (b).

Diverses études de modélisation ont été menées au cours des dernières années, et ont permis de mieux appréhender la structure complexe de la protéine CFTR, et de comprendre l'impact des mutations sur le repliement, l'adressage et le fonctionnement de ce canal. Dans un premier temps, c'est la structure 3D du domaine NBD1 qui a été identifiée [60,81,95], puis dans un second temps celle de la protéine entière [96,97]. Un autre modèle atomique du mécanisme d'ouverture / fermeture appelé « gating » (Figure 4) a été mis au point [98].

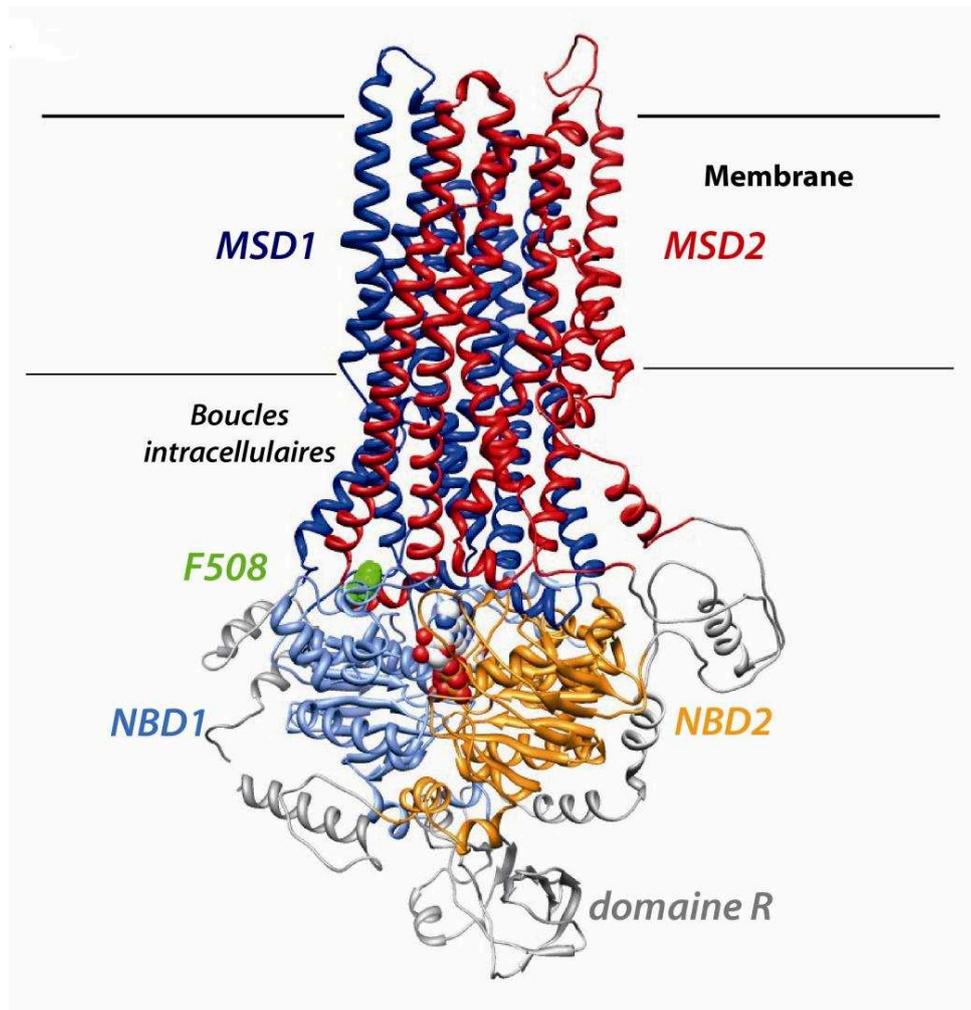


Figure 4 : Représentation structurale de la protéine CFTR sous sa forme ouverte (modifiée d'après [96,98]). Le modèle de la structure du CFTR a été réalisé par homologie avec la structure du transporteur bactérien Sav1866, dont la structure a été déterminé préalablement par cristallographie [96]. Sont mis en évidence les sites de liaison des molécules d'ATP (sphères d'atomes), le domaine régulateur R (en gris) et le résidu F508, situé dans le domaine NBD1 (en vert).

Les récentes données structurales sur CFTR ouvrent des perspectives intéressantes non seulement pour l'étude des bases moléculaires des fonctions de cette protéine, mais aussi pour le criblage et la conception rationnelle de petites molécules pouvant permettre de corriger les défauts liés aux mutations au niveau du gène CFTR. Des premiers résultats encourageants ont déjà conduit à identifier des modulateurs spécifiques (correcteurs, potentiateurs), ciblant les différentes interfaces de la structure multidomaine du CFTR [99]. Il est cependant nécessaire, d'optimiser les méthodologies de recherche, de pouvoir disposer de méthodes expérimentales permettant de démontrer sans équivoque une interaction directe entre ces modulateurs spécifiques et la protéine CFTR, et développer ainsi des molécules thérapeutiques efficaces.

4.2 Expression de la protéine CFTR

La protéine CFTR est majoritairement exprimée au pôle apical de nombreuses cellules épithéliales, notamment dans les voies respiratoires, les canaux pancréatiques et biliaires, le système digestif, l'appareil reproducteur et les glandes sudoripares [47–51]. L'étude de l'expression de l'ARNm CFTR dans les voies aériennes, a révélé une importante hétérogénéité d'expression de la protéine CFTR dans les cellules bronchiques [100]. Les cellules ciliées de l'épithélium de surface sont celles qui expriment le plus la protéine, alors qu'aucune expression n'est détectée dans les cellules caliciformes [49]. Quant aux glandes sécrétoires des voies aériennes, la forte expression du CFTR a été mise en évidence au niveau des cellules glandulaires séreuses et dans les cellules épithéliales bordant le canal collecteur [49,100,101]. L'expression du gène CFTR laisse supposer que son expression est spécifique des cellules épithéliales. Cependant, l'analyse du promoteur du gène CFTR suggère qu'il est un gène de ménage « **housekeeping** », ce qui impliquerait donc une expression plus étendue à d'autres types cellulaires. En effet, il a été récemment montré par cytométrie en flux, que les leucocytes expriment à des niveaux détectables la protéine CFTR [102]. Déjà en 1991, Yoshimura et al. ont souligné la présence de faibles taux de transcrits d'ARNm CFTR dans les leucocytes humains [45]. Mais ce n'est que récemment que la protéine CFTR a été détectée dans les neutrophiles [103,104], les lymphocytes [105,106], et les monocytes [107,108], dans lesquels l'implication du CFTR dans la régulation du potentiel des membranes a été observée [107]. Les monocytes peuvent se différencier en macrophages, et des études ont démontré que le CFTR pourrait être impliqué dans les fonctions des cellules immunitaires telles que l'inflammation [109] et les activités bactéricides [110,111].

4.3 Fonctions de la protéine CFTR

La protéine CFTR (ABCC7) [112], est la seule protéine de la famille des transporteurs ABC à posséder une fonction de canal ionique. Elle est essentiellement exprimée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales à fonction exocrine, permettant le transport des ions Cl^- au niveau des voies respiratoires et digestives. Le CFTR est essentiellement un canal à ions Cl^- AMPc – dépendant [46,113], mais qui permet également le passage des ions halogénures comme le Br^- , I^- , et le F^- [46,113], de d'autres anions, comme le bicarbonate [114], du glutathion [115,116], et de l'ATP [117]. Chez les patients atteints de mucoviscidose des concentrations significativement diminuées de glutathion ont été observées au niveau des voies respiratoires, ayant pour effet de nombreuses conséquences physiopathologiques bien identifiées [118]. En effet, compte tenu du rôle essentiel de la glutathion comme un antioxydant, un mucolytique, et un régulateur de l'inflammation, de la réponse immunitaire et

Chapitre I : La mucoviscidose

de la viabilité des cellules par l'intermédiaire de son état d'oxydo-réduction dans le corps humain, il est raisonnable de supposer que cette molécule joue un rôle important dans la mucoviscidose [118]. L'activité du canal CFTR est contrôlée par la fixation et l'hydrolyse de l'ATP au niveau des domaines NBDs, ainsi que par la phosphorylation du domaine régulateur R [83,88,92,112,119–121].

L'existence d'anomalies diverses au niveau des épithéliums des patients CF laisse supposer que la protéine CFTR pourrait réguler les fonctions de d'autres canaux ioniques [122], ayant un impact sur les mouvements de l'eau et participant ainsi à la bonne hydratation et au maintien de l'homéostasie du fluide périciliaire [66,122,123] (Figure 5). En effet, il a été observé que le canal CFTR stimule les canaux chlorures rectifiant sortant ORCC [124,125], en les rendant sensibles au Glibenclamide, un inhibiteur du CFTR [126]. L'activité du canal sodique ENaC est régulée négativement par la protéine CFTR [127]. Il limite ainsi l'absorption des ions Na^+ par les cellules épithéliales [66,127–129]. Les canaux potassiques ROMK sont aussi sous contrôle du canal CFTR [66,122,130].

La présence d'une protéine CFTR altérée est à l'origine des troubles hydroélectrolytiques de l'atteinte respiratoire chez les patients mucoviscidosiques [131], incluant entre autre, une hyperabsorption des ions sodium par les canaux ENaC [127,129], et une baisse de la sécrétion des ions chlorures, ce qui conduit à la déshydratation des sécrétions et à la formation d'un mucus hypervisqueux à l'origine des occlusions intestinales et respiratoires [127,131]. Des travaux récents, ont constaté que la perte de perméabilité apicale au Cl^- seule est insuffisante pour expliquer les propriétés bioélectriques des épithéliums mucoviscidosiques, et qu'une augmentation de la perméabilité apicale au Na^+ doit être impliquée, ce qui confirmerait qu'ENaC est une cible thérapeutique importante pour le traitement de la mucoviscidose [132]. En effet, il a été montré que la protéine *sgk1* (serum-glucocorticoid-kinase 1) affectant la dégradation d'ENaC était surexprimée dans les voies respiratoires des patients mucoviscidosiques [133], ce qui peut expliquer l'hyperabsorption des ions Na^+ au niveau de l'épithélium respiratoire. Au niveau cutané, l'altération du canal CFTR se traduit par une mauvaise réabsorption des ions Cl^- au niveau des glandes sudoripares, d'où une sueur concentrée en NaCl [28].

Les mécanismes exacts par lesquels le canal CFTR régule l'ensemble des canaux ioniques ne sont pas encore entièrement identifiés. Ainsi, certaines études ont suggéré une interaction entre les domaines NBD1 et R du CFTR et les sous-unités α du canal ENaC [134]. Mais cette hypothèse est remise en cause, car selon d'autres travaux, l'inhibition de l'activité ENaC nécessite les extrémités cytosoliques des unités β et γ du canal ENaC [135]. Cependant,

Chapitre I : La mucoviscidose

d'autres études ont démontré que l'effet du CFTR sur l'activité du canal ENaC est due à l'effet de la conductance de chlorure médiée par le CFTR sur le potentiel membranaire, et non pas le résultat d'une influence spécifique et directe du CFTR sur ENaC [136,137].

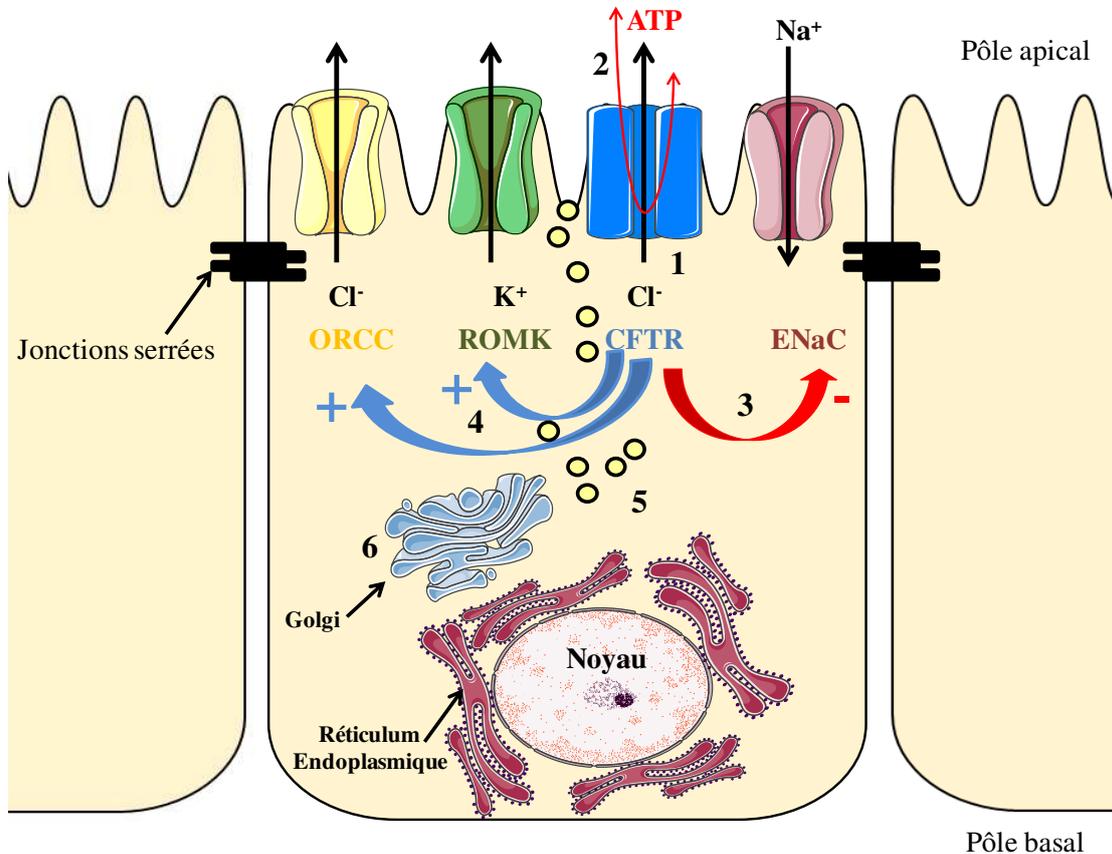


Figure 5 : Principales fonctions régulatrices de la protéine CFTR (modifiée d'après [66]). La protéine CFTR est un canal Chlore (1), elle facilite la sortie de l'ATP (2), elle régule négativement les canaux ENaC (3), et positivement les canaux ORCC et ROMK (4). Elle intervient également dans le recyclage des membranes (5), et dans la régulation du pH des organites intracellulaires (6).

Le CFTR interviendrait dans d'autres processus cellulaires, tels que le recyclage des membranes (Figure 5) [138,139]. Des études ont démontré que l'annexine V, un marqueur courant d'apoptose ayant un rôle dans la réparation des membranes [140], est directement impliquée dans la régulation de l'activité du canal CFTR [141]. Il a été par ailleurs suggéré que la protéine CFTR régulerait aussi le pH des organites intracellulaires et serait donc nécessaire pour une acidification normale des compartiments intracellulaires et pour la dégradation des bactéries par les hydrolases acides lysosomales [110,142–144]. En effet, une mauvaise acidification des organites intracellulaires des cellules épithéliales

Chapitre I : La mucoviscidose

mucoviscidosiques entraînerait une hypersulfatation et une sialylation altérée des protéines et des lipides impliqués dans l'apparition abondante des récepteurs aGM1 (Asialoganglioside 1) spécifiques de *Pseudomonas aeruginosa* [143]. Cela reste cependant une hypothèse très controversée [144].

5 Physiopathologie de la maladie

La mucoviscidose est une maladie multiviscérale, qui affecte l'ensemble des épithéliums à fonction exocrine des voies respiratoires, du tractus digestif, des organes génitaux et des glandes sudoripares. Le tableau clinique est donc très polymorphe. Les atteintes respiratoires sont aujourd'hui la principale cause de morbidité et de mortalité, et c'est pour cela qu'elles constituent la cible privilégiée des nouvelles thérapies (Figure 6).

5.1 Atteintes respiratoires

La protéine CFTR pourrait avoir un rôle durant le développement [145]. En effet, durant les deux premiers trimestres de grossesse, la protéine CFTR est très fortement exprimée dans les cellules souches du tissu épithélial respiratoire. Cette forte expression pourrait être sous contrôle de facteurs impliqués dans le développement précoce des voies pulmonaires et dans la différenciation alvéolaire [146,147]. Cette expression diminue au cours du développement pour devenir plus faible chez l'adulte. Ainsi, le développement du système respiratoire pourrait être altéré en cas d'absence ou d'une présence d'une protéine CFTR défectueuse, ce qui pourrait expliquer les importantes anomalies pulmonaires structurelles et fonctionnelles observées chez les nouveau-nés atteints de mucoviscidose avant toute infection symptomatique [148,149].

Les atteintes respiratoires sont très précoces. Dans plus de 80% des cas, elles apparaissent au cours de la première année de vie [148,149]. Chez les nouveau-nés et le petit enfant les symptômes sont marqués par une toux chronique et des infections fréquentes des voies respiratoires. Chez les enfants plus âgés et les adultes atteints de mucoviscidose, d'autres complications plus sévères s'ajoutent au tableau clinique; inflammation chronique, fibrose du foie, ...etc. À terme, ceci entrave la fonction pulmonaire, la fonction du pancréas et celle de d'autres organes en raison des occlusions respiratoires et intestinales causées par le mucus visqueux. Cet environnement est propice aux infections bactériennes opportunistes. En effet, l'altération des mécanismes de clairance mucociliaire associée à une diminution des propriétés antibactériennes du mucus sont des facteurs propices à l'apparition d'une infection précoce devenant rapidement chronique avec des phases d'exacerbations entraînant une réaction inflammatoire chronique [149–151]. Un cercle vicieux de surinfection par des

Chapitre I : La mucoviscidose

bactéries résistantes aux antibiotiques et d'inflammation s'installe, menant progressivement à une fibrose sévère du tissu pulmonaire, et par conséquent, à une fonction respiratoire compromise. Les pathogènes initialement retrouvés sont le *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenza*. Au cours de la progression de la maladie apparaît le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*, retrouvé chez plus de 80% de patients adultes [152]. À un stade plus avancé de la pathologie, les infections bactériennes sont à l'origine de pneumopathies graves, constituant la principale cause de mortalité chez les patients [153].

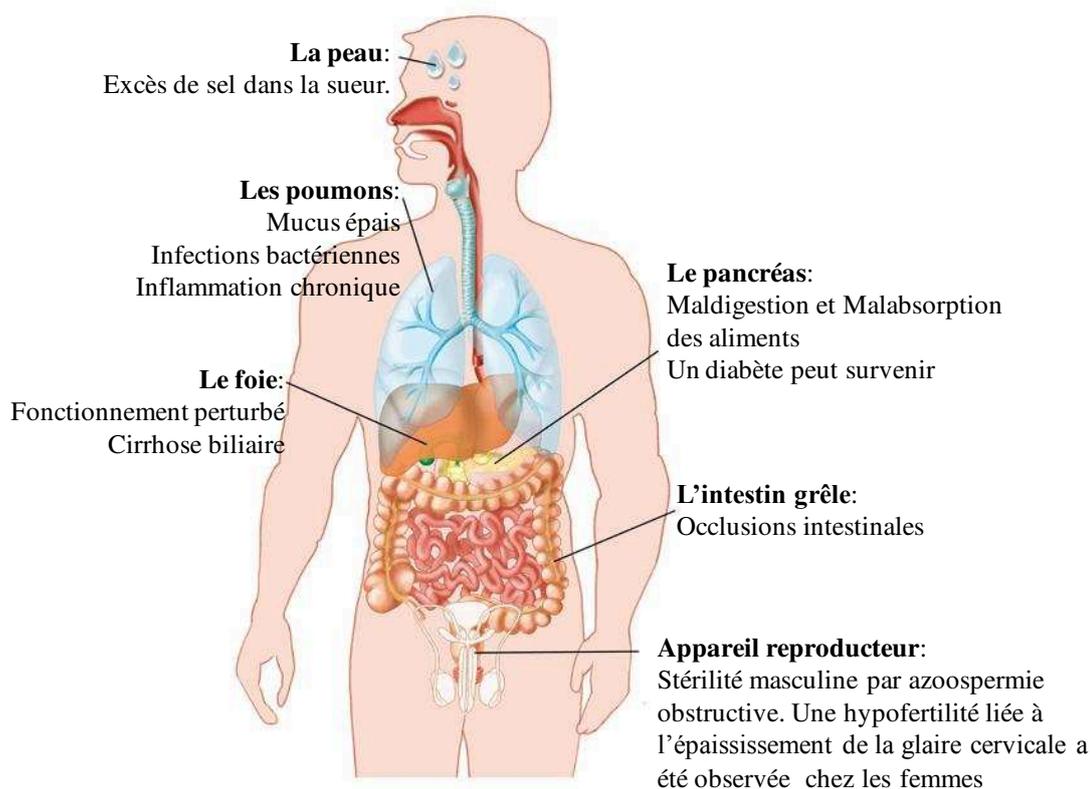


Figure 6 : Principales atteintes de la mucoviscidose (modifiée d'après [19,154]).

5.2 Autres atteintes

Les patients atteints de mucoviscidose présentent également d'autres manifestations de type pancréatiques, hépatobiliaires, génitales et autres.

5.2.1 Atteintes intestinales

Chez le nouveau-né, l'occlusion intestinale qui se produit en raison de matières fécales gluantes et visqueuses se manifeste par un **iléus méconial**, est l'un des premiers signes de cette pathologie. Cette occlusion intestinale a longtemps été la cause principale de mortalité jusqu'à la mise au point d'un traitement par les lipases.

Chapitre I : La mucoviscidose

5.2.2 Atteintes pancréatiques

Les manifestations pancréatiques représentent l'atteinte digestive majeure. Il s'agit d'une insuffisance pancréatique exocrine, c'est-à-dire un défaut de production des enzymes du pancréas (lipases, trypsine,...) due à une obstruction des canaux pancréatiques. Ses enzymes normalement excrétées dans la lumière intestinales, vont dégrader le tissu pancréatique et induire ainsi une fibrose d'où le nom de fibrose pancréatique (Cystic Fibrosis). Cette insuffisance pancréatique présente chez plus de 90% des patients est à l'origine d'une malabsorption des graisses, des protéines et des vitamines, responsable d'une diarrhée chronique grasseuse, associée à une anémie, à des troubles carenciels, un défaut de croissance et un retard pubertaire [59,155]. Un diabète lié à un défaut d'organisation des îlots de Langerhans et donc à une altération de la sécrétion d'insuline [156,157], ainsi qu'une pancréatite [158], peuvent également survenir.

5.2.3 Atteintes hépatobiliaires

L'atteinte hépatique se manifeste principalement par une hépatomégalie dans environ 20% des cas. Les lésions hépatobiliaires observées sont liées à l'obstruction des voies biliaires hépatiques. Dans certains cas, l'évolution des lésions conduit à une cirrhose du foie.

5.2.4 Atteintes génitales

Chez les hommes atteints de mucoviscidose, une stérilité due à une agénésie bilatérale des canaux déférents est observée dans 98% des cas. Chez les femmes atteintes, une hypofertilité liée à l'épaississement de la glaire cervicale a été observée [159]. Néanmoins, la survenue d'une grossesse n'est plus rare de nos jours.

D'autres atteintes peuvent également être observées. Citons l'atteinte des voies aériennes supérieures qui se manifeste par une sinusite chronique, et plus rarement par l'apparition de polypes nasaux. Également, l'altération du transport ionique au niveau des glandes sudoripares conduit à une concentration anormalement élevée du NaCl dans la sueur.

6 Diagnostic et dépistage

6.1 Diagnostic

Le diagnostic de la mucoviscidose peut être réalisé à différentes périodes de la vie [160,161], dès la naissance face à un iléus méconial ou à une détresse respiratoire, plus tardivement dans l'enfance voire à l'âge adulte, face à des symptômes cliniques variables spécifiques décrits précédemment. Le diagnostic peut également se faire en période prénatale, principalement chez les couples apparentés à un enfant atteint, ou chez lesquels on détecte un signe d'appel à l'échographie pendant la grossesse. Ce signe correspond à une occlusion

Chapitre I : La mucoviscidose

intestinale suite à la production excessive de mucus qui peut s'accumuler dans l'intestin pendant la vie fœtale entraînant par conséquent une obstruction abdominale. Celle-ci peut alors être détectée à l'échographie réalisée pendant le suivi de la grossesse. Le prolapsus rectal chez le nourrisson est également évocateur de la pathologie. Un « test de sueur » encore très utilisé de nos jours est donc mis au point, pour doser les ions chlorures dans la sueur [28–31]. Celui-ci est positif lorsque la concentration d'ions chlorures dans la sueur est $>$ à 60 mmol/L, des analyses génétiques approfondies consistant à rechercher les principales mutations typiques de la maladie sont effectuées. Si ce génotypage ciblé est négatif, l'ensemble des exons est alors analysé.

6.2 Dépistage

6.2.1 Dépistage néonatal

Un programme pilote de dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose a été mis en place en Bretagne [162,163], puis étendu à l'ensemble du territoire français depuis 2002. Ce dépistage (test de Guthrie) est réalisé trois jours après la naissance, par dosage d'une enzyme pancréatique ; la trypsine immunoréactive (TIR) sur une goutte de sang prélevée au talon des nouveau-nés sur papier buvard [162–164]. Les bénéfices apportés par ce dépistage ont permis une meilleure prise en charge des patients et ainsi une amélioration de la qualité de vie et une augmentation de l'espérance de vie des patients.

6.2.2 Dépistage prénatal

Dans le cas d'antécédents familiaux ou de la connaissance de l'hétérozygotie dans le couple, un diagnostic prénatal peut être effectué en cas de grossesse. À partir d'une biopsie des villosités choriales, le génome fœtal peut être analysé de manière fiable dès la 10^{ème} semaine d'aménorrhée. Une amniocentèse peut être pratiquée à partir de la 18^{ème} semaine de grossesse, si l'analyse du génome n'est pas possible. En cas de découverte d'une obstruction intestinale ou l'absence d'une vésicule biliaire visible lors d'une échographie, une amniocentèse peut également être demandée par les médecins. En France, quelques diagnostics préimplantatoires ont également été réalisés chez des familles ayant déjà eu des enfants atteints.

7 Traitements de la mucoviscidose et prise en charge

Au stade final de cette pathologie, la fonction respiratoire est sévèrement compromise. Il y a quelques décennies, les personnes touchées par la mucoviscidose mouraient dès le plus jeune âge. Aujourd'hui, grâce aux avancées thérapeutiques et du dépistage, l'espérance de vie

Chapitre I : La mucoviscidose

des patients est largement améliorée et les nouveau-nés souffrant de mucoviscidose auront de bonnes chances d'atteindre environ l'âge de 50 ans.

7.1 Traitements symptomatiques

À l'heure actuelle, la mucoviscidose n'est traitée que de façon symptomatique à l'exception de certaines mutations, visant à pallier les différentes carences. Ce type de traitement est complexe et contraignant. Chaque jour les personnes atteintes par la mucoviscidose doivent effectuer et compléter une combinaison des thérapies suivantes :

La prise en charge de l'atteinte respiratoire repose essentiellement sur une **kinésithérapie respiratoire quotidienne** pour aider à évacuer le mucus épais et visqueux qui obstrue les voies respiratoires, associée à une **antibiothérapie** pour lutter contre les infections. En parallèle, des produits comme les mucolytiques et la rhDNase (Pulmozyme[®]) sont utilisés par voie d'inhalation afin de diminuer la viscosité du mucus et faciliter ainsi la kinésithérapie respiratoire. Des anti-inflammatoires ainsi que des bronchodilatateurs sont également utilisés. Cependant, à long terme, les anti-inflammatoires entraînent une immunodéficience, une ostéoporose, une insuffisance surrénalienne et une hypercholestérolémie, qu'il faut prévenir grâce à un régime alimentaire adéquat ainsi que certaines suppléments. La transplantation pulmonaire n'est proposée qu'au stade ultime de la maladie, quand le patient devient dépendant de l'oxygénothérapie.

Le traitement de l'atteinte digestive repose sur l'administration d'enzymes pancréatiques pour améliorer l'absorption des nutriments vitaux et la digestion. Des suppléments multivitaminés (A, D, E et K) et d'oligo-éléments sont également administrés, car un mauvais état nutritionnel peut entraîner de graves conséquences, tel qu'un retard de croissance staturo-pondéral et aggraver la fonction respiratoire.

La prise en charge globale du patient comprend l'éducation thérapeutique du malade et de son entourage et l'adaptation de son mode de vie (scolarité, projets professionnels et personnels) en fonction de l'évolution de sa maladie. Un soutien psychologique est par ailleurs nécessaire.

De nombreuses voies de recherche dans le domaine des traitements symptomatiques sont actuellement en cours d'essais cliniques, les plus importantes sont regroupées dans le tableau ci-dessous (Tableau I).

Chapitre I : La mucoviscidose

concomitante de la tobramycine affecte négativement le mécanisme de translecture médié par Ataluren [169]. Ainsi, un essai clinique de phase III avec Ataluren est lancé chez les patients mucoviscidosiques ne prenant pas de tobramycine [169]. Ataluren est également testée pour le traitement d'autres maladies génétiques, comme la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et de Becker (DMB) chez les patients porteurs des mutations non-sens [170–172]. Récemment, des dérivés d'Ataluren (PTC124) ont été développés [173]. Sur des modèles cellulaires CF et non CF, ces nouvelles molécules ont montré une efficacité supérieure à celle de PTC124 dans la translecture des codons stop prématurés avec une faible toxicité [173]. L'analyse des résultats suggère une potentielle interaction entre les dérivés de PTC124 et l'ARNm muté [173].

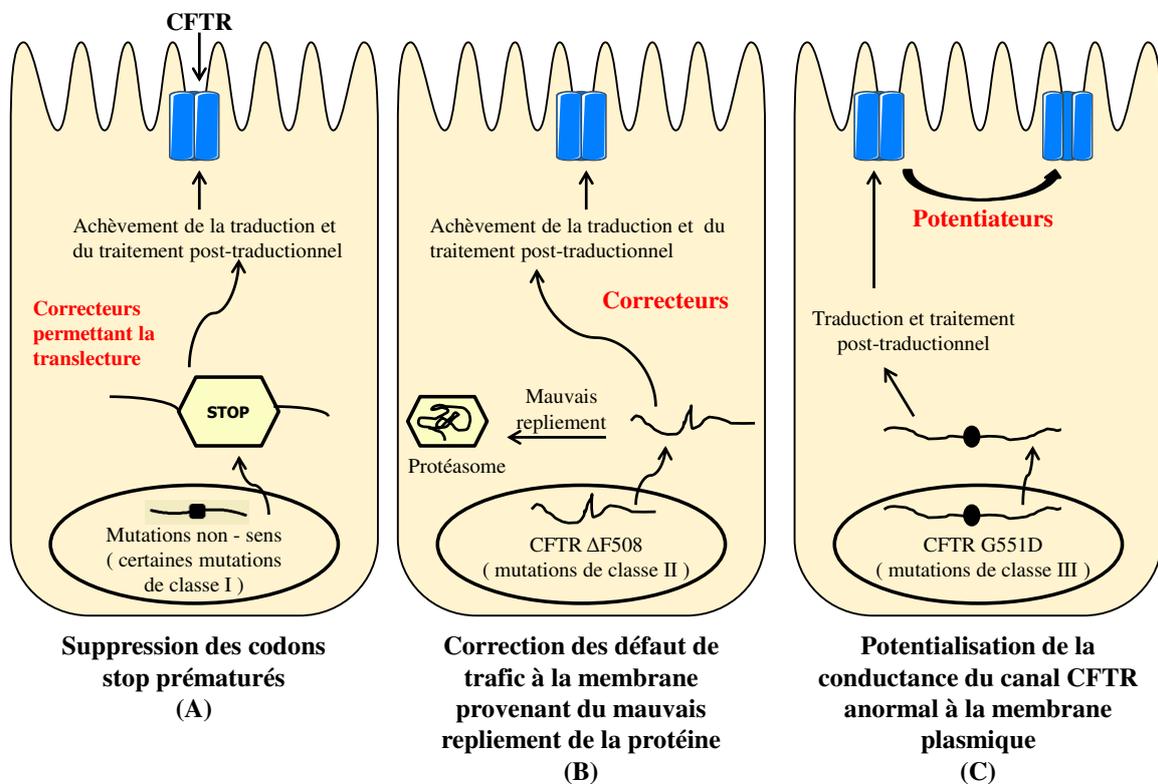


Figure 7 : Thérapie protéique de la mucoviscidose (modifiée d'après [167]).

7.2.2 Correction des mutations de classe II

Des molécules ciblant les mutations de classe II (mutation $\Delta F508$), dites **correctrices** ont été mises au point. Ces molécules améliorent le trafic intracellulaire de la protéine CFTR, ce qui augmente la quantité de protéines exprimées à la surface cellulaire (Figure 7B). Parmi elles, le **Vx-809 (Lumacaftor)** qui se lie au domaine MSD1 de la protéine mutée pour induire des protéines de conformation stable [174]. La spécificité du Vx-809 dépend donc de la structure du domaine MSD1 [174]. Le correcteur Vx-809 administré seul, réduit considérablement l'excès de chlore dans la sueur, mais aucune amélioration statistiquement

Chapitre I : La mucoviscidose

significative de la fonction CFTR dans l'épithélium nasal (mesure de la différence de potentiel nasal), et de la fonction pulmonaire (FEV₁ pour Forced Expiratory Volume in 1 second) des patients porteurs de la mutation $\Delta F508$ n'a été observée [175]. Le Vx-809 est bien toléré à toutes les doses [175,176]. Des données suggèrent que l'utilisation du Vx-809 en combinaison avec un autre correcteur de CFTR qui supprime les défauts de repliement peut en outre améliorer la fonction de la protéine CFTR chez les individus porteurs de la mutation $\Delta F508$ [174].

7.2.3 Correction des mutations de classe III et IV

Des molécules pouvant **potentialiser l'activité des protéines mutées localisées à la membrane** ont été développées pour les mutations de classe III et IV (Figure 7C). Parmi elles, le **Vx-770** appelé aussi **Ivacaftor** est particulièrement efficace pour les patients porteurs de la mutation G551D [177–179], à la fois sur le CFTR sauvage et muté [180]. En effet, l'administration orale du Vx-770 résulte en une restauration de la sécrétion des ions Cl⁻ au niveau de l'épithélium nasal et sudoral, mais surtout en une nette et rapide amélioration des fonctions respiratoires, un gain de poids et une amélioration de la qualité de vie des patients [177,178]. Cette molécule est une avancée importante pour les patients, néanmoins son prix (environ 230 000 euros par an, soit 630 €/jour pour 2 comprimés) reste beaucoup trop élevé [181]. Le Vx-770 est aussi efficace chez les patients porteurs de mutations de classe III autres que la mutation G551D [182]. Cependant, le Vx-770 seul n'est pas efficace chez les patients homozygotes pour la mutation $\Delta F508$ [183]. Le Vx-770 est aussi évalué chez les personnes porteuses des mutations de classe IV (R117H) [184]. Actuellement, le Vx-770 est impliqué dans de nombreux essais cliniques en association avec d'autres molécules anti-infectieuses [185], et avec le correcteur Vx-809 ce qui améliore la FEV₁ chez les patients homozygotes pour la mutation $\Delta F508$ [186].

En effet, la nouvelle thérapie combinant les deux molécules **Lumacaftor** (correcteur conçu pour bien adresser la protéine CFTR défectueuse à la membrane) et **Ivacaftor** (potentialisateur qui améliore les fonctions du canal CFTR) (**Orkambi™**) chez les patients homozygotes pour la mutation $\Delta F508$ améliore nettement le trafic intracellulaire de la protéine CFTR, améliorant ainsi la FEV₁ et réduit les exacerbations pulmonaires [187,188]. Cependant, cette co-administration semble moins bénéfique pour les individus hétérozygotes pour la mutation $\Delta F508$ [168,188]. Ce traitement est approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour une utilisation chez les patients mucoviscidosiques ayant 12 ans et plus [165]. Une autre molécule correctrice **Vx-661** en combinaison avec **Ivacaftor** est actuellement en cours d'évaluation, pour laquelle des résultats encourageants lors de l'essai clinique de phase II ont

Chapitre I : La mucoviscidose

été rapportés chez les patients homozygotes pour la mutation $\Delta F508$ [176,184]. En effet, l'administration du Vx-661 seul ou en combinaison avec le Vx-770 résulte en une baisse du taux de sel dans la sueur et une amélioration significative de la FEV₁ au bout de 28 jours par rapport aux contrôles [176,189]. Plusieurs essais de phase III seront menés en 2015 chez les personnes ayant une ou deux copies de la mutation CFTR $\Delta F508$ [190].

D'autres molécules dites **Chaperonnes** (chimique et/ou pharmacologiques) sont également évaluées. Les chaperonnes chimiques sont définies comme étant des petites molécules non spécifiques ayant pour rôle de stabiliser les protéines cellulaires, par amélioration du taux de repliement, en agissant sur les protéines chaperonnes ou le protéasome plutôt que directement sur la protéine CFTR [191]. Les chaperonnes pharmacologiques quant à elles agissent directement sur la protéine CFTR mutée. Parmi ces molécules chimiques, le **sodium 4-phenylbutarate (4PBA)**, un acide gras à courte chaîne est capable in vitro de restaurer le transport des ions Cl⁻ dans les cellules épithéliales portant la mutation $\Delta F508$ [192], et régule négativement l'expression de la protéine Hsc70 [193], qui s'associe plus fortement avec le CFTR $\Delta F508$ qu'avec le CFTR normal favorisant ainsi la dégradation de la forme mutée [194]. Cependant, le mécanisme d'action du 4PBA n'est pas clair [192]. Une étude clinique ultérieure avait démontré que la prise orale (19 g/jour, 1 semaine) du 4PBA permet une restauration partielle de l'activité CFTR dans l'épithélium nasal des patients homozygotes pour la mutation $\Delta F508$, mais aucun effet sur les glandes sudoripares n'a été observé [195]. Cependant, dans une autre étude clinique il a été démontré qu'une administration orale de 20 g de 4PBA induit une restauration significative du transport du chlore dans l'épithélium nasal des patients porteurs de la mutation $\Delta F508$ [196]. Il a également été suggéré que la combinaison du 4PBA avec des flavonoïdes (source importante d'antioxydants appartenant à la famille des polyphénols) pourrait restaurer la fonction du canal CFTR dans les voies aériennes des patients mucoviscidosiques [176,197]. Les flavonoïdes (polyphénols) peuvent moduler l'expression de nombreux gènes régulés par le facteur de transcription NF κ B [198]. Un screening à haut-débit a permis d'identifier des chaperonnes pharmacologiques importantes le **VRT-325** et le **VRT-532** [199]. Le VRT-325 se lie de manière allostérique au CFTR $\Delta F508$ permettant éventuellement la sortie du réticulum endoplasmique, mais il n'est pas spécifique de la mutation $\Delta F508$. [200]. Sur modèles de cellules épithéliales respiratoires humaines porteuses de la mutation $\Delta F508$, le **VRT-532** est identifié comme un potentialisateur de la protéine CFTR [199]. Par la suite, des études précliniques ont démontré que le VRT-532 peut fonctionner comme correcteur de la protéine CFTR dans le cas des mutations $\Delta F508$ et G551D [201–204], en augmentant le taux de liaison et d'hydrolyse de

Chapitre I : La mucoviscidose

l'ATP [204]. En effet, le VRT-532 augmente l'affinité de liaison de l'ATP à la protéine CFTR muté après activation de la protéine kinase A [205].

L'inhalation de la poudre sèche du mannitol (**Bronchitol™**), un agent osmotique non-ionique [206], pourrait être un traitement efficace pour réhydrater le mucus et ainsi désencombrer les voies respiratoires [94,207]. L'inconvénient de la poudre du mannitol est sa taille relativement importante, de sorte que le dépôt dans les sites cibles, les petites voies respiratoires et la périphérie du poumon est difficile à réaliser [208,209]. Par le même mécanisme que la solution hypertonique saline, le mannitol a des effets rhéologiques sur le mucus, la perturbation des liaisons hydrogènes induit une diminution de la viscosité du mucus, ce qui par conséquent augmente sa clairance [210]. Une étude a démontré que l'inhalation de 400 mg de mannitol (**Bronchitol™**) améliore considérablement la FEV₁ et la FVC (Forced Vital Capacity, qui correspond à la quantité d'air qui peut être expirée de force des poumons après une profonde respiration), d'où son évaluation en clinique en phase III [94,211]. L'étude clinique de phase III (chez des enfants CF ≥ 6 ans) montre une nette amélioration de la FEV₁ et une réduction d'environ 35% de la fréquence des exacerbations pulmonaires [212], et par conséquent la fonction pulmonaire est améliorée [213], après 26 semaines. Même si un essai chez les patients CF ayant entre 6 et 17 ans est actuellement en cours [214], des études supplémentaires approfondies sont nécessaires avant d'évaluer le mannitol chez les patients de moins de 6 ans.

Certaines approches pharmacologiques visant les canaux régulés par le CFTR (Figure 8), comme le canal ENaC, les canaux CaCC (Ca²⁺ activated Cl⁻ Chanel), ou les récepteurs purinergiques P2Y₂, pourraient être bénéfiques pour le traitement de mucoviscidose [94]. L'activité du canal ENaC contribue à la physiopathologie de la mucoviscidose en réduisant la fluidité périciliaire. Des inhibiteurs directs ou indirects ont donc été développés pour réduire l'hyperabsorption du Na⁺ et augmenter la fluidité du mucus [215,216]. L'activité ENaC peut être bloquée par des inhibiteurs spécifiques tels que l'amiloride, le benzamil, le phenamil et probablement par l'activation de la PKC [188]. Également, l'activation des récepteurs purinergiques par l'ATP, UTP ou Dénufosol inhibe les canaux ENaC, en plus de l'activation des canaux CaCC [215]. Les amilorides et leurs dérivés (benzamil et phenamil) ont une application thérapeutique limitée en raison de leur absorption et élimination rapide des poumons [217]. Le composé GS-9411 (Gilead-Science) maintient l'activité ENaC bloquée à 75 % à la surface apicale des cellules [218,219]. Cependant, dans l'essai clinique de phase I, chez les personnes saines le GS-9411 bloque également les canaux ENaCs rénaux provoquant une hyperkaliémie cliniquement significative [214,220]. Par conséquent, l'essai de phase I a

Chapitre I : La mucoviscidose

été arrêté en 2009 [221]. Les pyrazinoyles amines quaternaires structurellement différentes des pyrazinoyles guanidines amilorides, sont particulièrement efficaces sur les cellules bronchiques humaines et in vivo (cochon d'inde) sur la perméabilité cellulaire et l'inhibition d'ENaC [222]. In vivo, le composé 12g (α amine quaternaire ramifié) inhibe ENaC et induit une différence de potentiel 16 fois supérieure à celle induite par l'amiloride [222]. L'inhibition d'ENaC peut se faire également de manière indirecte via diverses molécules. Ainsi, la prostatine, une trypsine-sérine protéase appartenant à la famille des CAP (Channel-Activating Protease) qui clive les sous unités du canal ENaC à des sites spécifiques, augmentant ainsi son activité constitue une cible thérapeutique importante [216]. La molécule Camostat (Novartis Pharmaceuticals) inhibitrice de la prostatine a été mise au point et a donné des résultats prometteurs in vivo [223]. Dans l'étude Clinique de phase II [224], Camostat (spray nasal) réduit le transport des ions Na^+ , provoquant un changement de la NDP (Nasal Potential Difference) de +13.1 mV par rapport à la valeur initiale, mais certains patients avaient développé de graves effets secondaires tels que l'épistaxis, perturbation de la muqueuse nasale, et une hématurie [225]. Une sensibilité nasale et une rhinorrhée ont également été observées [225]. Cependant, il existe des préoccupations sur la spécificité de Camostat pour certaines CAPs et l'incertitude quant à la sécurité et la tolérance d'administration de Camostat via un nébuliseur dans les petites voies respiratoires [225].

D'autres pistes sont également étudiées. En effet, l'ouverture du canal ENaC est maintenue par la fixation du PIP_2 (Phosphatidyl inositol diphosphate) sur la sous unité β du canal [226]. Les agonistes du récepteur P2Y_2 purinergique diminuent le taux de PIP_2 par son hydrolyse en IP_3 (inositol triphosphate) par la phospholipase C, réduisant par conséquent l'activité ENaC et augmentent l'hydratation du mucus [226]. Ces agonistes augmentent également le transport des ions Cl^- via l'activation des canaux CaCC [227,228]. Ces constatations ont donné lieu à la synthèse du **Dénufosol** (diadenosine 5'-polyphosphates) [229], qui inhibe le transport des ions sodium via ENaC [230], et augmente celui des ions chlorures via l'activation des canaux CaCC [230], ce qui résulte en une amélioration de la fluidité du mucus et de la clairance mucociliaire. L'essai clinique de phase III [231], avec le **Dénufosol** montre une bonne tolérance et une amélioration de la FEV_1 . Ces changements au niveau pulmonaire sont faibles mais significatifs [232]. Cependant, dans un second essai de phase III [231], ces bénéfices n'ont malheureusement pas été retrouvés [233]. En effet, le Dénufosol a induit des changements moyens non significatifs de la FEV_1 , qui peuvent être liés soit au faible nombre de patients inclus dans l'étude par rapport au premier essai, soit au fait que le Dénufosol ne parvient pas à long terme à empêcher le déclin de la fonction respiratoire [233]. Également,

Chapitre I : La mucoviscidose

le **P-1037** inhibiteur des canaux ENaC dans les cellules des voies respiratoires est actuellement en essai clinique de phase II. Ce composé peut prolonger la fluidité des voies respiratoires après l'utilisation de la solution saline hypertonique, ce qui facilitera l'évacuation du mucus permettant ainsi de retrouver une hydratation normale du mucus [165]. Cependant, il est important de noter que le blocage excessif des canaux ENaC peut causer de graves conséquences, soit un œdème pulmonaire par l'intermédiaire de l'accumulation indésirable de liquide dans les poumons [234]. Des molécules ciblant les canaux CaCC ont également été identifiées (Figure 8). Parmi elles, le peptide polycyclique bactérien duramycine (**Moli1901**) (Lancovutide, Lantibio-AOP Orphan Pharmaceuticals AG) administré par inhalation active les canaux CaCC au niveau de l'épithélium des voies respiratoires par libération du Ca^{2+} des réserves intracellulaires [235]. L'essai clinique de phase II a démontré que la nébulisation de duramycine (2,5 mg/jour, 5 jours) entraîne une augmentation de la FEV₁ de 8% et une bonne tolérance du produit avec une longue demi-vie, et que la duramycine ne passe pas dans la circulation sanguine [236]. Une autre étude clinique de phase II réalisée en 2008 a rapporté des résultats prometteurs, à savoir une amélioration de la FEV₁ [237].

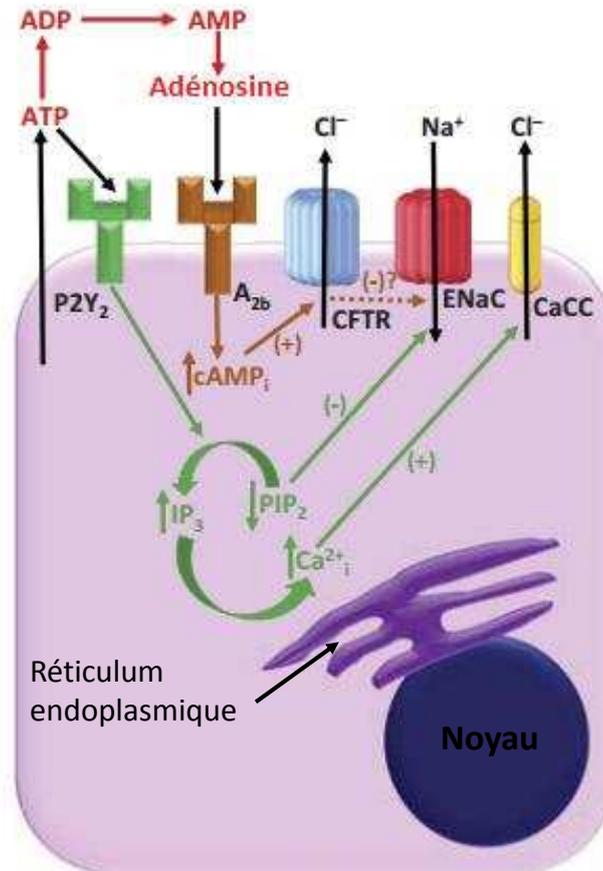


Figure 8 : Résumé des approches pharmacologiques ayant pour but d'hydrater le mucus des patients CF (modifiée d'après [94]). Comme pour les molécules correctrices ou des potentialisateurs du CFTR, diverses approches pharmacologiques ciblant le récepteur P2Y₂, ENaC et le CaCC sont en cours d'évaluation pour tenter de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de la mucoviscidose.

Récemment le comité des médicaments à usage humain (CHMP) a émet trois avis positifs en faveur de l'autorisation de mise sur le marché ou d'extension d'indication de OrkambiTM et KalydecoTM. Ces avis concernent l'autorisation d'utilisation d'OrkambiTM chez les patients homozygotes pour la mutation Δ F508 âgés de 12 ans et plus, de KalydecoTM chez les enfants de 2 à 5 ans, porteurs d'une des 9 mutations « gating », et de KalydecoTM chez les patients de 18 ans et plus porteurs de la mutation R117H [238]. Beaucoup d'autres molécules sont actuellement à différentes phases d'évaluation clinique (Tableau I).

7.3 Thérapie génique

Le clonage du gène CFTR a ouvert la voie à la thérapie génique. Bien que la mucoviscidose soit une maladie multiviscérale, la détérioration de la fonction respiratoire est la principale cause de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose. Ainsi,

Chapitre I : La mucoviscidose

l'épithélium respiratoire constitue le tissu cible pour la thérapie génique de la mucoviscidose. Le principe consiste à transférer une copie du gène CFTR normal dans les cellules des voies respiratoires afin de restaurer l'activité du canal CFTR par l'expression d'une protéine fonctionnelle, et ainsi améliorer la fonction respiratoire. Contrairement à la thérapie protéique, cette approche concerne tous les patients atteints de mucoviscidose quel que soit la mutation dont ils sont porteurs. Le gène CFTR transporté par un vecteur peut être administré directement dans les voies aériennes par aérosol. Cette méthode est en effet la moins invasive. En raison du renouvellement permanent de l'épithélium pulmonaire, la thérapie génique devra semblablement être répétée dans le temps, à moins de parvenir à transfecter efficacement les cellules souches de l'épithélium respiratoire. Pour mieux comprendre les principales stratégies de la thérapie génique de la mucoviscidose, il est important de décrire un certain nombre des caractéristiques biologiques et fonctionnelles de l'organe cible, en l'occurrence les poumons et l'épithélium respiratoire.

8 Le système respiratoire

8.1 Anatomie et fonctions du système respiratoire

La principale fonction de l'appareil respiratoire est de fournir de l'oxygène à l'organisme et de le débarrasser du gaz carbonique (CO₂), qui est un déchet produit par la fonction cellulaire, par des échanges gazeux entre l'air et le sang. Le système respiratoire est composé de voies aériennes divisées en **voies aériennes supérieures** comprenant le nez, le pharynx et le larynx, et en **voies aériennes inférieures** composées de la trachée et de l'arbre bronchique jusqu'aux alvéoles pulmonaires (Figure 9A). D'un point de vue fonctionnel, le système respiratoire est constitué d'une **zone de conduction**, d'une **zone de transition** et d'une **zone respiratoire** (Figure 9B).

La zone de conduction comprend toutes les voies respiratoires (voies aériennes supérieures et une partie des voies aériennes inférieures; de la trachée aux bronchioles terminales), qui acheminent l'air à la zone respiratoire, mais ne participe pas aux échanges gazeux.

La zone de transition est composée des bronchioles respiratoires.

La zone respiratoire est le siège des échanges gazeux et représente une surface d'environ 140 m² [239]. Elle commence à l'endroit où les bronchioles terminales rejoignent les bronchioles respiratoires. Celles-ci se prolongent par les conduits alvéolaires, auxquels font suite les atriums alvéolaires, les sacs alvéolaires et les alvéoles, les cavités où l'essentiel des échanges gazeux sont réalisés (Figure 9B et D).

Chapitre I : La mucoviscidose

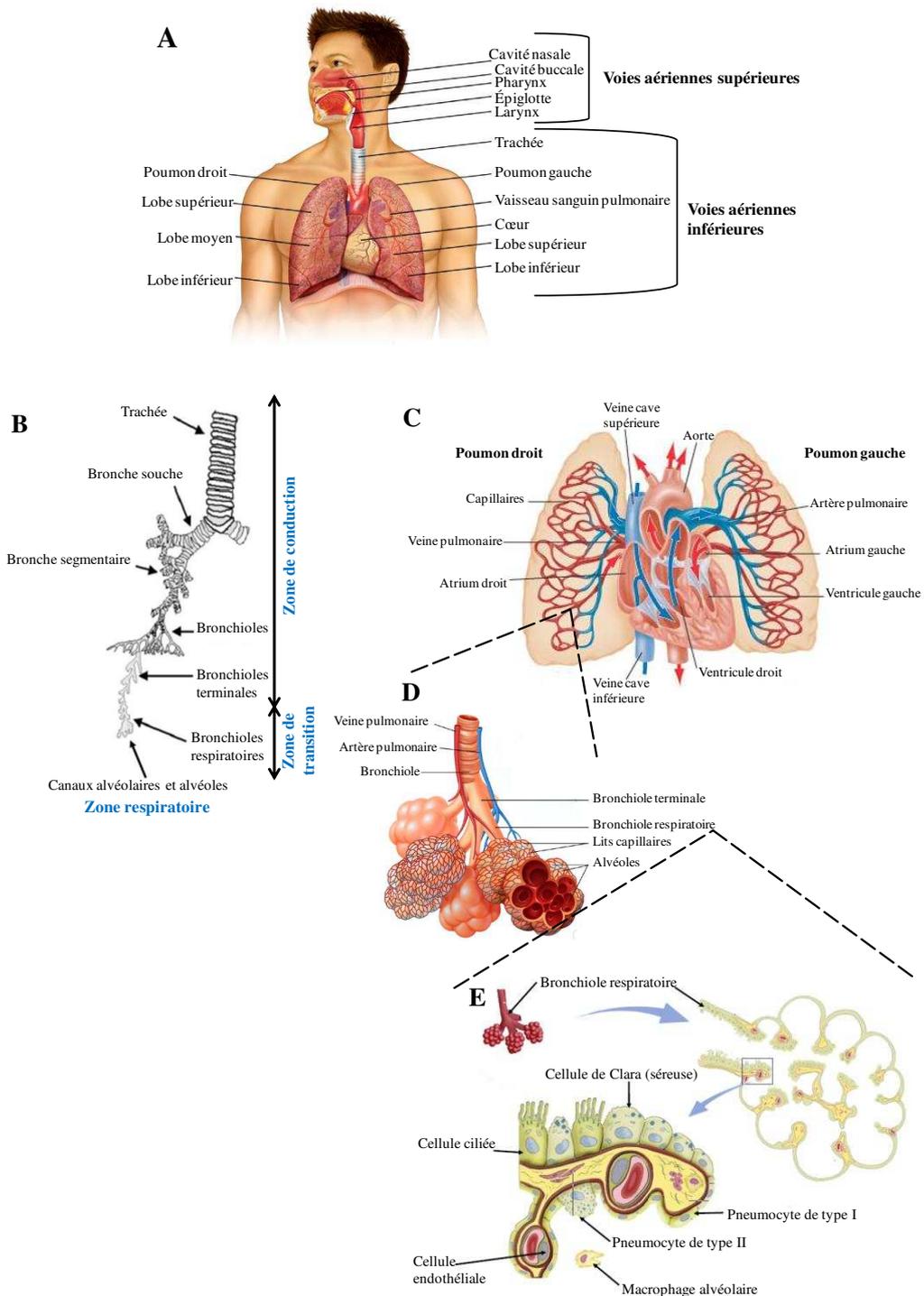


Figure 9 : Architecture anatomique (A) et fonctionnelle (B) du système respiratoire humain. Illustration de la circulation pulmonaire (C), et des alvéoles pulmonaires situées à l'extrémité des bronchioles, où s'effectuent les échanges gazeux (D) (modifiées d'après [240,241]), et illustration de la composition cellulaire des bronchioles respiratoires (E) (modifiée d'après Appareil respiratoire. Manuel MARK, Institut d'Embryologie, Hôpital Universitaire de Strasbourg, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire).

Chapitre I : La mucoviscidose

Les voies respiratoires, et particulièrement les voies aériennes inférieures, ont une structure complexe. En effet, l'arbre trachéobronchique est une succession de subdivision allant de la trachée jusqu'aux sacs alvéolaires. La **trachée** s'étend du larynx au médiastin (espace entre les deux poumons), et se divise en deux bronches principales, ou **bronches souches** (Figure 9B), qui s'enfoncent dans chaque poumon et qui se subdivisent elles-mêmes en **bronches lobaires** ou secondaires (trois pour le poumon droit et deux pour le poumon gauche) (Figure 9A). Les bronches lobaires donnent naissance aux **bronches segmentaires** (ou tertiaires), lesquelles se subdivisent ensuite en bronchioles de plus en plus petites, jusqu'aux bronchioles terminales et respiratoires (Figure 9B). Ces dernières à leur tour se divisent en canaux alvéolaires et donnent naissance aux sacs alvéolaires formés de plusieurs alvéoles pulmonaires (Figure 9B, D). Ainsi, le diamètre des conduits aériens diminue au fil des subdivisions, allant d'environ de 1.8 cm pour la trachée à environ 0.04 cm pour les canaux alvéolaires [239].

Pour assurer les échanges gazeux, L'appareil respiratoire est vascularisé via deux circulations distinctes (Figure 9C) :

La circulation bronchique : elle fait partie de la circulation systémique. Elle amène le sang oxygéné via les artères bronchiques à la zone de conduction (bronches et bronchioles) de l'arbre trachéobronchique.

La circulation pulmonaire : permet l'apport des éléments nutritifs à la zone de transition et respiratoire. Elle véhicule le sang veineux (non oxygéné) par l'artère pulmonaire, qui se subdivise en lits capillaires entourant les alvéoles, où se fait l'échange gazeux (Figure 9D). Le sang oxygéné gagne ensuite l'oreillette gauche via les veines pulmonaires.

8.2 Composition de l'épithélium respiratoire

La composition de l'épithélium des voies respiratoires est variable d'une zone à une autre (Figure 10 et 11). De la trachée jusqu'aux bronchioles, l'épithélium respiratoire est **pseudostratifié et cilié**, recouvert par un liquide de surface périciliaire et le mucus (Figure 10), qui servent de barrière physique vis-à-vis des particules inhalées qui s'y trouvent piégées [242]. Le mucus produit par les cellules sécrétrices de surface (cellules de Clara, cellules caliciformes et cellules séreuses) et les glandes sous muqueuse, participe également à la défense anti-bactérienne, anti-protéasique, anti-oxydante et anti-microbienne des voies aériennes [243,244]. En effet, la composition biochimique du mucus est riche en molécules protectrices telles que les protéines antimicrobiennes (IgA), la lactoferrine, le lysozyme et les défensines et mucines [243].

Chapitre I : La mucoviscidose

L'ensemble des cellules de l'épithélium respiratoire sont ancrées à la lame basale, à l'exception de certaines d'entre elles qui s'allongent jusqu'à la lumière bronchique [242]. Globalement, les cellules de l'épithélium respiratoires sont les cellules basales, ciliées, mucosécrétrices, neuroendocrines et intermédiaires, avec un réseau de glandes sous – muqueuses contenant des cellules sécrétrices muqueuses et séreuses (Figure 10).

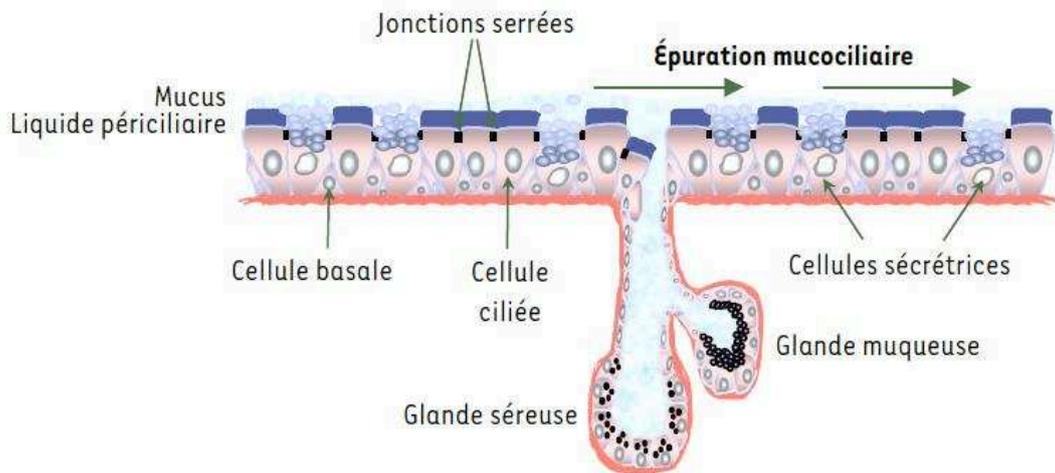


Figure 10 : Structure et composition de l'épithélium respiratoire des voies aériennes humaines (modifiée d'après [242]).

Les bronchioles les plus proximales sont bordées par un épithélium pseudostratifié, qui comprend quelques rares cellules basales, ciliées et des cellules sécrétrices non ciliées appelées cellules de **Clara**, tandis que l'épithélium des bronchioles les plus distales est monostratifié dépourvu de cellules basales [242]. Les cellules de Clara localisées dans la trachée et dans les petites voies respiratoires ont plusieurs fonctions protectrices pulmonaires. Elles ont un rôle dans le métabolisme des xénobiotiques, dans la régulation locale de la réponse inflammatoire et immunitaire, et dans la régénération de l'épithélium respiratoire bronchique. Elles participent également à la clairance mucociliaire des particules étrangères et aussi à la prolifération / différenciation des cellules ciliées pour le maintien de la population des cellules ciliées [245,246]. Elles sont aussi impliquées dans la sécrétion des protéines tensioactives du surfactant (apoprotéines A, B et D), des protéases, des peptides antimicrobiens, de plusieurs cytokines et chémokines et des mucines [245].

Au niveau de la trachée (Figure 11), l'épithélium est cylindrique, pseudostratifié et formé de cellules ciliées, de cellules caliciformes (ou cellules en gobelet) et de cellules basales enfouies. Les cellules caliciformes sécrètent le mucus constitué principalement de mucines, qui empêche la déshydratation de l'épithélium respiratoire, l'accumulation des particules

Chapitre I : La mucoviscidose

étrangères ou encore l'adhésion et l'invasion de pathogènes [247]. La paroi des bronches principales est de composition histologique proche de celle de la trachée, mais au fil des ramifications, on observe un certain nombre de changements. En effet, l'épithélium passe de cylindrique pseudostratifié à cylindrique puis à cubique dans les bronchioles terminales. Il n'y a ni cils, ni cellules muqueuses dans les bronchioles ; par conséquent, les débris logés dans les bronchioles ou plus bas sont normalement détruits par les macrophages présents dans les alvéoles. En effet, les alvéoles abritent des macrophages alvéolaires (Figure 9E), communément appelés cellules à poussières, qui éliminent les poussières, les bactéries et autres particules étrangères inspirées avec l'air. La paroi des alvéoles est constituée d'une couche unique de cellules épithéliales pavimenteuses minces et étalées appelées **pneumocytes de type I** ou épithéliocytes respiratoires (Figure 9E et 11), qui malgré leur faible nombre (5 à 10% des cellules pulmonaires totales) [248], recouvrent plus de 90% de la surface alvéolaire [248,249]. Elles sont rattachées les unes aux autres par des jonctions serrées qui servent de barrière partiellement étanche à la diffusion des fluides et molécules dans l'espace intra-alvéolaire. Il a été rapporté que les pneumocytes de type I, jouent un rôle actif dans la perméabilité à l'eau et dans la régulation de l'homéostasie du liquide alvéolaire chez les rongeurs [250,251]. Ils jouent aussi un rôle de protection de l'épithélium respiratoire vis-à-vis du stress oxydatif chez le rat [252]. Les alvéoles sont également recouvertes par une trame dense de capillaires pulmonaires, tandis que leurs ouvertures sont entourées par quelques fibres élastiques. Les alvéoles, les capillaires ainsi que leurs lames basales forment **la membrane alvéolo-capillaires** (barrière air – sang). Des cellules de forme cubique d'un diamètre de 50 µm chez l'homme, appelées **pneumocytes de type II**, sont par ailleurs dispersées entre les pneumocytes de type I, et sont majoritairement retrouvées à la jonction de deux alvéoles (Figure 9E) [249]. Bien qu'ils soient très nombreux (60% environ des cellules alvéolaires et 15% des cellules pulmonaires totales), ils ne recouvrent que 2 à 5% de la surface alvéolaire [249]. Les pneumocytes de type II sécrètent et recyclent un liquide, le **surfactant alvéolaire**, qui tapisse la surface interne des alvéoles exposées à l'air alvéolaire, et participe à l'efficacité des échanges gazeux [249,253]. Elles participent à la réponse immunitaire dans les poumons, et peuvent se transformer en pneumocytes de type I pour réparer l'épithélium endommagé ou bien lors du développement fœtal des poumons [249]. Les pneumocytes de type II, tout comme les pneumocytes de type I, participent au transport ionique [254]. Ces cellules expriment une large gamme de protéines impliquées dans le transport ionique, telles que les canaux ENaCs [255–260], Na⁺-K⁺-ATPase [256,260–263], les aquaporines (AQP3) [249], et le transporteur ABC CFTR [264].

Chapitre I : La mucoviscidose

Le **surfactant alvéolaire** permet d'abaisser la tension superficielle air/liquide afin d'éviter que les alvéoles pulmonaires ne s'affaissent sur elles – mêmes suite à l'expiration [253]. Il est composé principalement de phospholipides (80 à 90%), de protéines biologiquement actives (SP-A, SP-B, SP-C et SP-D environ 6 à 8%), de lipides neutres principalement du cholestérol (4 – 7%) et d'hydrates de carbone en faibles quantités. Le surfactant alvéolaire ou pulmonaire est éliminé par le biais de la clairance mucociliaire et les macrophages, mais la grande partie du liquide est recyclée par les pneumocytes de type II en vue d'une utilisation ultérieure [249,253,263].

Chapitre I : La mucoviscidose

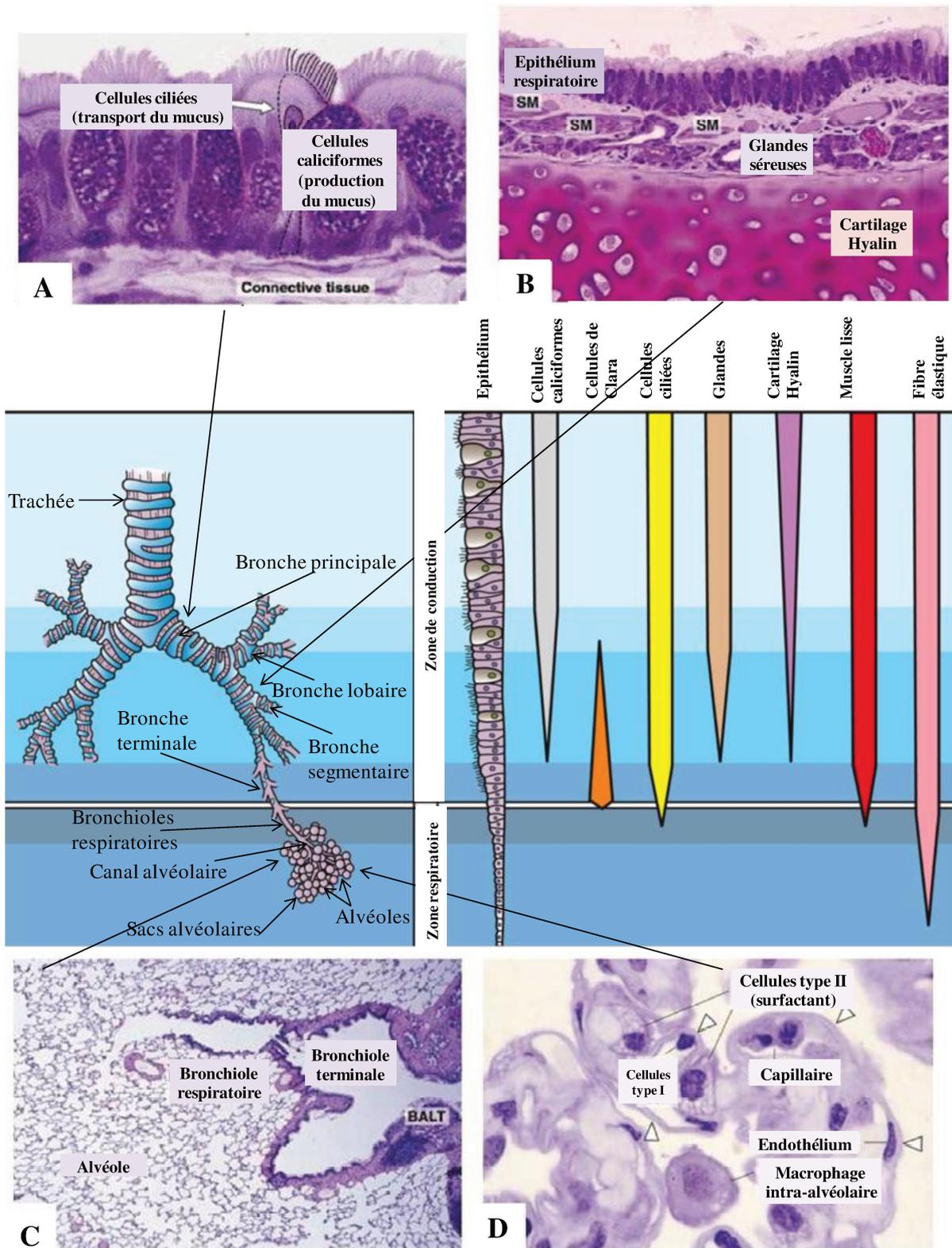


Figure 11 : Composition qualitative de l'épithélium de l'arbre trachéobronchique, illustrée par des coupes histologiques au niveau de la trachée (A), des bronches (B), des bronchioles terminales et respiratoires (C) et des alvéoles (D) (modifiée d'après [265,266]).

8.3 Les cellules cibles de la thérapie génique

En raison de la gravité des atteintes respiratoires, le tissu cible du transfert de gènes est donc l'épithélium respiratoire. Diverses considérations particulièrement certaines mutations rares, suggèrent que la restauration d'une expression de l'ordre de 5 à 10 % du CFTR normal serait suffisante [267], du moins en ce qui concerne la restauration de la fonction du canal à chlorures. L'épithélium respiratoire contient en moyenne 1 à 2 copies de l'ARNm CFTR par cellules [100]. Les quantités les plus importantes sont retrouvées au niveau des glandes séreuses et des glandes sous – muqueuses (au niveau de la zone de conduction) [100]. Cependant, seulement 5% des cellules au niveau des bronchioles et des régions alvéolaires expriment l'ARNm CFTR [49]. Étant donné la faible expression globale de l'ARNm CFTR, la plupart des cellules épithéliales pulmonaires devraient subir un transfert du gène CFTR sauvage afin de restaurer la fonction de canal ionique du CFTR [268]. Aussi, vu le renouvellement permanent de l'épithélium respiratoire, la thérapie génique devra être répétée périodiquement, à moins de réussir à transfecter une proportion suffisante de cellules souches de l'épithélium respiratoire. Plusieurs cellules de l'arbre trachéobronchique présentent des propriétés de cellules souches, telles que les cellules basales, les cellules de Clara et les pneumocytes de type II [245,249,269,270]. Récemment, une nouvelle population de cellules souches a été identifiée [271]. Il s'agit de cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle épinière (BMDMSC pour Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell), qui probablement participent au renouvellement de l'épithélium des voies respiratoires des poumons [271]. La connaissance à propos des cellules souches pulmonaires s'améliorent progressivement et peuvent constituer de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des maladies pulmonaires sévères. Globalement, les spécialistes estiment qu'une expression du CFTR dans 5 à 10 % des cellules épithéliales pulmonaires permettrait de corriger le défaut de transport des ions chlorures [272–274]. L'approche consistant à combiner le gène SCNT (Somatic Cell Nuclear Transfer) avec le rAAV (recombinant Adeno-Associated Virus) dans les fibroblastes primaires a conduit à la génération réussie de modèles CF de furet [275] et de porc [276] en 2008. Ces nouveaux modèles animaux sont plus représentatifs du phénotype et des multiples atteintes caractéristiques de la mucoviscidose [277]. Contrairement aux souris, les voies aériennes des furets et des porcs présentent un haut degré de similitude avec les voies aériennes humaines [278–281], et ont une composition similaire des canaux chlorures au niveau des voies respiratoires [282]. La mise au point des modèles CF porc et furet [41,277], devrait être très utile pour étudier les conséquences respiratoires de la mucoviscidose et ainsi développer et tester de nouvelles approches

Chapitre I : La mucoviscidose

thérapeutiques dans des conditions plus proches de la réalité. Un certain nombre de modèles animaux CF existe, tels que le modèle porc CFTR- Δ F508 [283]. Cependant, la recherche est en continue afin de développer de nouveaux modèles (furet, porc) portant d'autres mutations CFTR, permettant ainsi l'évaluation d'une large gamme de stratégies de thérapie génique et cellulaire.

Chapitre II : La thérapie génique

Le concept de thérapie génique imaginé il y a quelques années pour les maladies génétiques, est porteur d'espoir pour un grand nombre de maladies. Il s'agit en effet d'une application des connaissances de la génétique et de la biologie moléculaire à des fins thérapeutiques. À l'origine, elle consistait à transférer une version normale d'un gène dans les cellules cibles pour remplacer celui défectueux responsable de la pathologie. À la différence des médicaments qui agissent sur l'activité des protéines et sur les fonctions cellulaires, la thérapie génique cherche à intervenir plus en amont, à la source même du dysfonctionnement, ce qui ouvre ainsi de nouvelles perspectives dans le traitement d'autres affections jusque-là incurables. Les avancées technologiques permettent sans cesse d'élargir les domaines d'applications. Ainsi, il est primordial d'avoir une vue globale sur les champs d'applications de la thérapie génique et les approches utilisées, qui doivent être adaptées à la pathologie ciblée.

1 Principe de la thérapie génique

Si le principe de la thérapie génique repose sur l'idée simple de transférer dans les cellules cibles de l'organisme le gène thérapeutique, sa mise en œuvre est beaucoup plus complexe. On distingue, la thérapie génique sur cellules somatiques et sur cellules germinales avec des conséquences différentes. La thérapie génique germinale n'a pas d'indications thérapeutiques chez l'homme et est formellement interdite (transmission de la modification génétique à la descendance). Ainsi, nous nous intéressons uniquement à la thérapie génique somatique. Cette dernière apporte une correction de l'anomalie génétique, sans affecter le patrimoine génétique de l'individu traité. Pour soigner une maladie héréditaire, il n'est donc pas nécessaire de corriger le défaut génétique dans toutes les cellules de l'organisme mais uniquement dans celles des organes touchés. Un diagnostic préimplantatoire des embryons peut être réalisé chez des familles qui risquent de transmettre une anomalie génétique à leur descendance. Ce test a pour objectif de sélectionner les embryons sains à transférer dans l'utérus maternel, évitant ainsi la nécessité de mettre fin à une grossesse. Des essais de fécondation in vitro et des tests de diagnostic préimplantatoire des embryons, ont permis la naissance d'une fille saine de parents homozygotes pour la mutation $\Delta F508$ [284]. Cette approche peut être applicable à d'autres maladies monogéniques, pour lesquelles le défaut génétique a été identifié, cependant une analyse profonde est nécessaire afin de mieux adapter la stratégie à la pathologie. Pour les maladies génétiques comme la mucoviscidose, l'épithélium respiratoire doit être traité précocement. Pour cela la correction génétique in utero semble d'un réel intérêt

Chapitre II : Thérapie Génique

thérapeutique et paraît tout à fait envisageable. En effet, une étude avait montré que le transfert du gène CFTR associé à un adénovirus recombinant (rAd) *in utero*, a permis une amélioration très importante de la survie des souris *cf^{-/-}*, même si l'expression du transgène CFTR était transitoire [285]. Cependant, ces résultats n'ont pas pu être reproduits par la suite [286,287]. Néanmoins, la thérapie génique *in utero* continue d'être activement explorée [288–290].

2 Stratégies et approches de la thérapie génique

Il existe deux principales stratégies pour le transfert de gènes chez un patient ; l'approche *ex vivo* et l'approche *in vivo*.

2.1 Approche *ex vivo*

L'approche *ex vivo* consiste à prélever les cellules cibles du patient, à les modifier *in vitro* en y apportant le gène d'intérêt, les amplifier pour les réinjecter par la suite chez le patient afin qu'elles remplacent au fur et à mesure les cellules anormales (Figure 12). Cette approche fut la première mise en œuvre chez l'homme, et s'est révélée efficace pour transfecter de nombreux types cellulaires tels que les fibroblastes, les hépatocytes et les cellules endothéliales. Elle est couramment utilisée dans les essais cliniques, particulièrement pour les maladies hématopoïétiques en raison de l'accessibilité des cellules souches sanguines. Elle a notamment été utilisée chez les « enfants bulles », pour le traitement des déficits immunitaires sévères. L'avantage de cette stratégie est qu'elle permet de s'affranchir des obstacles cellulaires rencontrés lors d'une administration directe (*in vivo*) chez le patient. Elle permet également de modifier une population cellulaire bien précise, sans risque de voir le vecteur pénétrer dans des cellules non ciblées. Cependant, toutes les cellules ne sont pas prélevables, et ce type d'approche ne peut donc être utilisé lorsqu'il s'agit de modifier certaines cellules différenciées de type cardiaque ou des neurones par exemple. Elle reste une approche coûteuse et complexe, en raison des différentes étapes et techniques utilisées (chirurgie, culture cellulaire, ...etc). Dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose, des études suggèrent que l'évaluation *ex vivo* des tissus des patients CF est non seulement essentielle pour diagnostiquer et prédire la gravité et l'évolution de la pathologie, mais est également cruciale pour l'évaluation de la réponse aux traitements et le développement d'une thérapie personnalisée en fonction de chaque phénotype [69]. En effet, il a été établi qu'après administration intratrachéale des cellules souches chez l'animal, celles-ci sont capables de se différencier en cellules épithéliales pulmonaires. Néanmoins, le pourcentage de cellules différenciées est trop faible (<0.01 – 0.025%) [288,291–295]. Une récente étude suggère que

Chapitre II : Thérapie Génique

les cellules souches mésenchymateuses (MSC) dérivées de la **gelée de Wharton** (tissu conjonctif embryonnaire) pourraient être une alternative efficace aux cellules souches embryonnaires ou de moelle osseuse [296]. Cependant, la faible incorporation des cellules souches reste un obstacle majeur dans le développement d'une thérapie cellulaire efficace pour la mucoviscidose. Beaucoup de progrès reste à faire avant que la thérapie ex vivo de la mucoviscidose devienne un traitement clinique efficace. En effet, la voie d'administration, la dose optimale, l'intervalle entre les administrations doivent être bien défini.

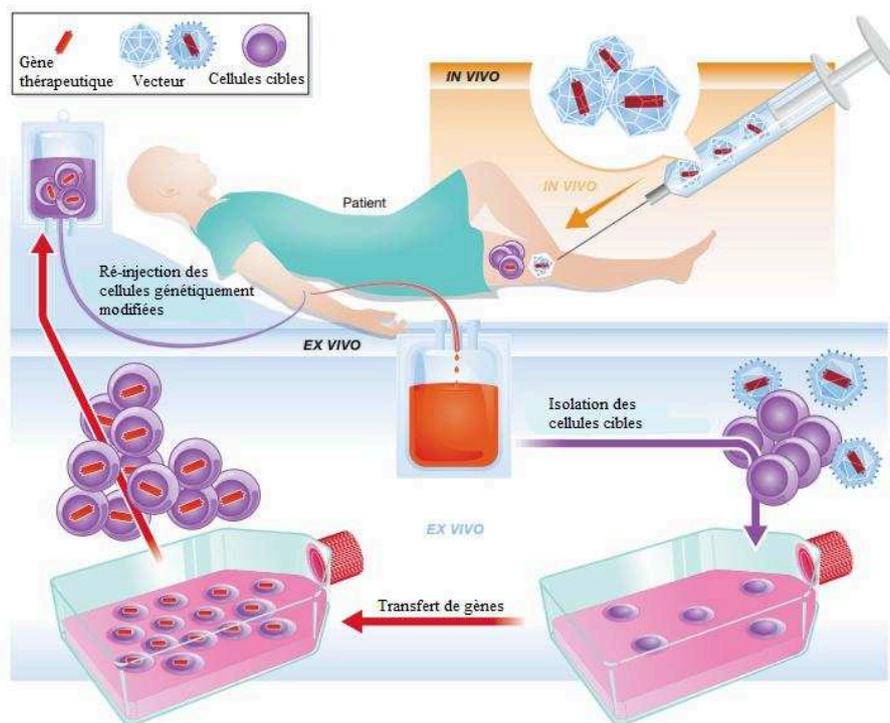


Figure 12 : Approches ex vivo et in vivo de thérapie génique. Lors d'une approche in vivo, le gène thérapeutique couplé à son vecteur est introduit directement dans le corps (ex : le muscle, le foie) du patient, alors que pour les applications ex vivo, les cellules du patient sont tout d'abord isolées à partir de l'organisme, puis modifiées génétiquement, sélectionnées et amplifiées, pour les réintroduire par la suite chez le patient comme une greffe autologue. (modifiée d'après [4]).

2.2 Approche in vivo

L'approche in vivo consiste à délivrer directement le gène thérapeutique couplé à un vecteur aux patients, par administration systémique ou locale (Figure 12). L'avantage de cette approche est qu'elle ne nécessite pas d'intervention chirurgicale, mais par contre, celle-ci nécessite le développement d'un vecteur sûr et efficace et une voie d'administration adaptée. La faisabilité de la technique est donc tributaire du vecteur qui pourra véhiculer le gène

Chapitre II : Thérapie Génique

d'intérêt jusqu'à sa cible. Selon la nature et l'accessibilité de l'organe cible, la quantité de matière nécessaire (ADN/vecteur) est souvent plus importante que celle utilisée pour l'approche ex vivo. L'efficacité de cette stratégie est également soumise aux nombreuses barrières intra - et extracellulaires que doivent surmonter le transgène et son vecteur pour atteindre la cible, selon la voie d'administration. Par ailleurs, pour les vecteurs synthétiques l'expression du transgène est transitoire et les administrations répétées sont donc nécessaires pour maintenir l'effet thérapeutique souhaité.

Selon l'effet thérapeutique attendu, différentes stratégies de transfert de gènes existent. Les principales sont décrites ci-dessous :

- **L'addition de gène** en complément du gène muté naturellement présent, c'est à dire qui laisse les allèles anormaux en place. Mise au point dès les débuts de la thérapie génique, elle reste l'approche la plus utilisée pour le traitement de la majorité des maladies monogéniques, comme la mucoviscidose, les myopathies ou les maladies du système immunitaire [297].
- **Induction de la mort cellulaire** : Lorsqu'il s'agit de traiter des pathologies tumorales ou infectieuses, l'introduction d'un gène conduisant à la mort des cellules cibles peut se faire soit directement en introduisant un gène apoptotique par exemple, soit indirectement en rendant les cellules tumorales sensibles à une drogue par l'apport d'un gène codant pour une enzyme (ex : HSV/tk) qui va transformer la pro-droque, comme le Ganciclovir en Ganciclovir-triphosphate, ce qui va aboutir à la mort des cellules cancéreuses et des cellules adjacentes [298–300].
- **Stimulation de la réponse immunitaire** : L'apport de certains gènes codant des protéines qui stimulent le système immunitaire comme les cytokines, les molécules du CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité) et les antigènes tumoraux permet de stimuler le système immunitaire. Les cellules du système immunitaire reconnaissent les cellules cibles comme du non-soi et induisent ainsi leur élimination. Cette stratégie peut être également utilisée dans le cas des maladies infectieuses en rendant les cellules cibles résistantes à un pathogène comme un virus, ou productrices de protéines de défense antivirales,...etc.
- **Inhibition de l'expression d'un gène cible ou rétablissement d'un transcrit fonctionnel** : Dans certains cas, la mutation génétique entraîne un gain de fonction lié à l'expression d'une protéine anormale à effets délétères. Ainsi, l'approche envisagée consiste en l'utilisation de séquences nucléiques codant pour un ARN anti-sens, des oligonucléotides anti-sens (ODN) [301], ou des ribozymes [302], afin d'induire un blocage de l'expression d'un gène pathogène, ou induire un saut d'exon porteur d'une anomalie génétique et aboutir

Chapitre II : Thérapie Génique

ainsi à la synthèse d'une protéine tronquée mais fonctionnelle. L'utilisation de petits ODN qui masquent certains sites d'épissage, a permis la restauration du cadre de lecture et par conséquent la synthèse de la dystrophine dans le cadre de la thérapie génique de la DMD [303,304].

- **Correction ciblée de mutations :** Elle consiste à effectuer une correction ciblée de la mutation ponctuelle in situ, afin de restaurer un phénotype normal en utilisant par exemple des oligonucléotides chimères (ARN/ADN) ou des oligonucléotides simples brins [305]. Le trans-épissage de l'ARNm est également une approche de correction ciblée, qui permet de remplacer une partie d'un pré-ARNm porteur d'une mutation par une séquence normale apportée par le transfert de gènes. Cette technique a d'ailleurs été utilisée pour essayer de corriger la mutation $\Delta F508$, et une restauration partielle de l'activité CFTR a été obtenue [306–308]. D'autres approches sont actuellement en cours de perfectionnement. Il s'agit des approches faisant appel à des enzymes artificielles utilisant l'ingénierie des nucléases à doigts de zinc (Zinc-Finger Nucleases, ZFNs) [309], des nucléases de transcription (activatrices/effectrices) dites TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) [310] et le système CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 nucleases) [311,312], et quelques résultats prometteurs ont déjà été rapportés. Appliquée à la mucoviscidose, cette approche a permis une correction ciblée de la mutation $\Delta F508$ par les ZFNs par recombinaison homologue [313]. Le système CRISPR/Cas9 a permis également une réparation endogène de mutations au niveau du locus CFTR des cellules souches intestinales de patients CF [314]. Ces approches récentes sont fort intéressantes, mais beaucoup de progrès restent encore à faire.

3 Pathologies ciblées

La thérapie génique est une approche prometteuse pour un grand nombre de pathologies, et à ce jour, environ 2210 essais cliniques sont ou ont été engagés dans le monde [315]. Bien que les applications initiales définies pour la thérapie génique fut de traiter les maladies héréditaires monogéniques, pour lesquelles le gène muté a été identifié et cloné, la grande majorité des protocoles cliniques concerne désormais les maladies acquises, notamment les cancers (64%) (Figure 13) [315]. Les affections monogéniques quant à elles ne représentent que 9.5% des essais cliniques (Figure 13), suivies par les maladies infectieuses et cardiovasculaires (7.9%). La principale raison est que les patients pouvant être inclus dans ces essais sont nombreux. De plus, les attentes thérapeutiques sont différentes. Pour les cancers,

Chapitre II : Thérapie Génique

une expression transitoire du transgène est suffisante, alors que pour les maladies génétiques, une expression soutenue est nécessaire.

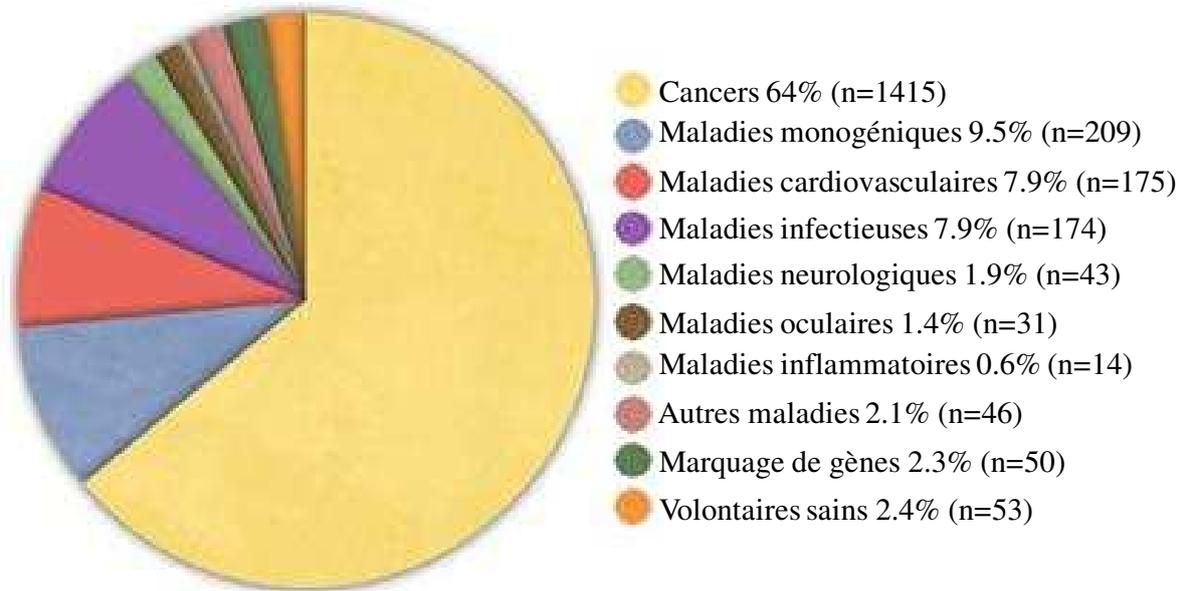


Figure 13 : Répartition des essais cliniques de thérapie génique selon la pathologie ciblée [315].

La majorité des essais cliniques réalisés sur les maladies monogéniques concerne la mucoviscidose [316]. Plusieurs essais cliniques utilisant des adénovirus ou adénovirus associés (AAV- CFTR) ont été réalisés dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose [317–320]. Récemment, un essai clinique utilisant un vecteur non-viral conduit par le Consortium Britannique de thérapie génique de la mucoviscidose a rapporté des résultats prometteurs [321]. Dans le cadre de cet essai clinique, 140 patients âgés de 12 ans ou plus ont été inclus dans l'essai [321]. Ils ont reçu par nébulisation une dose de 5 mL correspondant à une formulation contenant 13.3 mg du plasmide pGM169 (CpG-free) codant pour le gène CFTR humain, associé à 75 mg du lipide cationique GL67 (N4-spermine cholesterylcarbamate, Genzyme corporation) en présence de la DOPE (dioleoyl phosphatidyléthanolamine) ainsi qu'un stabilisateur stérique DMPE-PEG₅₀₀₀ (n=78), soit une solution saline 0.9% correspondant au placebo (n=62), une fois tous les 28 jours \pm 5 jours durant une année [321]. Après un an de traitement, les patients ayant reçu le traitement de thérapie génique (pGM169/GL67/DOPE/DMPE-PEG₅₀₀₀) montrent une amélioration de leurs fonctions pulmonaires, la FEV₁ étant supérieure au placebo de 3.7% [321]. Aucune différence significative n'a été enregistrée dans les deux groupes en ce qui concerne les effets indésirables [321]. De plus, Il est important de noter que la réadministration est possible et

Chapitre II : Thérapie Génique

qu'elle est souhaitable. Ces résultats soulignent l'importance des administrations répétées pour le traitement de la mucoviscidose en termes d'effets significatifs sur la fonction pulmonaire. En parallèle, une thérapie génique basée sur l'utilisation des lentivirus qui n'ont jusqu'à présent pas été testés dans des essais cliniques de la mucoviscidose, est développée par le Consortium Britannique de thérapie génique de la mucoviscidose [322]. En effet, de nombreuses études suggèrent que les lentivirus peuvent être bénéfiques pour le transfert de gènes à destination de l'épithélium pulmonaire [8,323,324]. La forme finale du virus ainsi que les doses à administrer ont été définies auparavant [322], et les études préliminaires de toxicité et de réactions secondaires n'ont pas montré de problèmes inattendus [322]. Un essai clinique de phase II visant à établir une étude complète et formelle de sécurité/efficacité est prévu en 2017 [322].

4 Moyens de transfert de gènes

Aujourd'hui le succès de la thérapie génique repose essentiellement sur la notion de transfert de gènes et le développement de « vecteurs » sûrs et efficaces, qui permettent le transfert de séquences d'acides nucléiques d'intérêt dans une cellule cible. On distingue principalement les vecteurs dérivés des virus dits vecteurs viraux et les systèmes non-viraux (Figure 14).

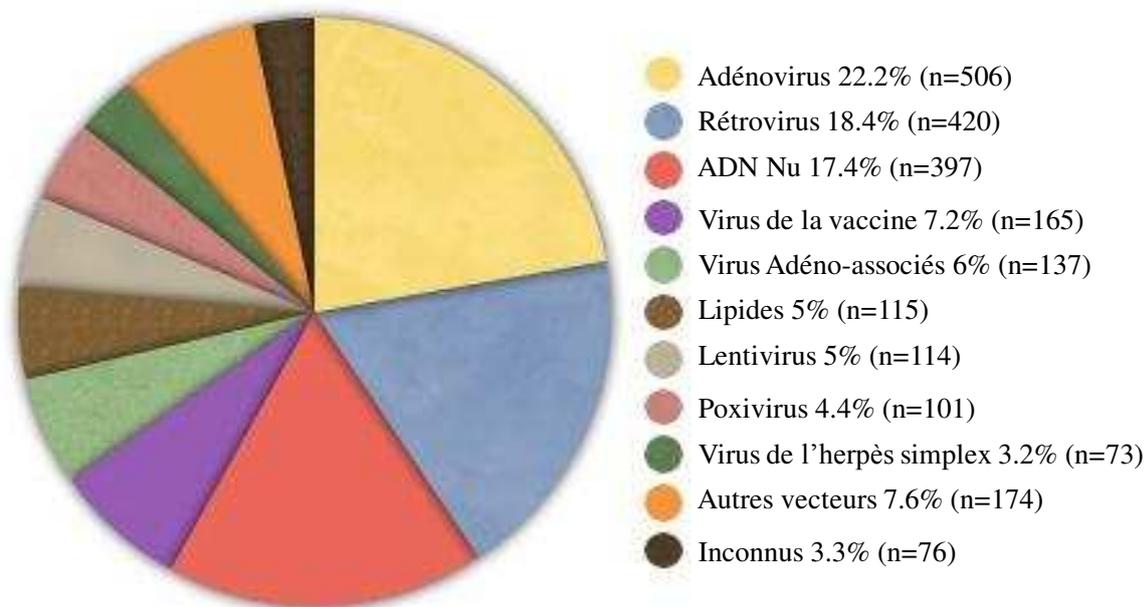


Figure 14 : Répartition des différents vecteurs utilisés dans le cadre des essais cliniques de thérapie génique en 2015 [325].

4.1 Les approches virales

Les vecteurs viraux appelés virus recombinants se définissent comme étant des particules virales contenant un génome viral modifié, où les gènes infectieux du virus ont été supprimés et remplacés par le gène d'intérêt. On parle alors de virus **désactivés** ou **sécurisés**, incapables de se multiplier et d'engendrer une infection virale. Les vecteurs viraux sont donc des vecteurs **naturels**, puisque leur caractéristique essentielle est d'exploiter la machinerie cellulaire afin de se répliquer et se disséminer dans l'organisme. Actuellement les vecteurs viraux sont utilisés dans la majorité des essais cliniques (Figure 14). Cependant, en dépit de leur efficacité, ces vecteurs présentent divers inconvénients comme la taille limitée du transgène, les réactions immunogènes et inflammatoires qui peuvent être particulièrement gênantes lors des réadministrations ultérieures, les risques de mutagenèse insertionnelle liés à une intégration non contrôlée du matériel génomique viral dans le génome du patient. Les vecteurs viraux se heurtent également aux problèmes de production à grande échelle (cout de production et surtout la reproductibilité des lots). La nature offre un large choix de virus que l'on peut modifier pour en faire des vecteurs. Les plus utilisés sont les adénovirus, les rétrovirus, les adénovirus associés (AAV), les virus de l'herpès simplex et les lentivirus (Figure 14).

4.1.1 Les adénovirus

Les premiers essais de thérapie génique de la mucoviscidose ont utilisés des vecteurs dérivés des adénovirus, en raison de leur tropisme naturel pour l'épithélium des voies aériennes [326]. Il s'agit de virus nus à ADN double brin de 36 à 40 kb et de diamètre d'environ 90 à 100 nm. Ces derniers sont capables d'entrer dans les cellules par endocytose grâce à des récepteurs cellulaires spécifiques CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor) [326], et peuvent transfecter efficacement les cellules quiescentes et en division, par un transfert épisomal de leur matériel génomique, ce qui élimine tout risque de mutagenèse insertionnelle.

Des études précliniques sur les épithéliums nasaux de patients CF et pulmonaires d'animaux modèles (souris) ont rapporté des résultats positifs et transitoires [327–329], en particulier sur le plan de la correction partielle de la différence de potentiel transépithéliale (DDP) [330], ainsi qu'une bonne tolérance chez l'homme à des doses faibles voire intermédiaires [331]. Néanmoins, chez les patients mucoviscidosiques, la thérapie génique à l'aide des adénovirus n'a pas donné des résultats encourageants [332]. En effet, des réactions inflammatoires importantes ont été rapportées. De telles réactions sont sans doute favorisées

Chapitre II : Thérapie Génique

dans le cas de la mucoviscidose, au vu de l'état inflammatoire sous-jacent. L'autre inconvénient de ce type de vecteurs est leur faible entrée dans les cellules de l'épithélium respiratoire [333]. En effet, les récepteurs CAR spécifiques des adénovirus sont absents à la surface apicale des cellules épithéliales pulmonaires humaines [326]. Ces récepteurs sont exprimés au pôle baso-latéral des cellules épithéliales [326], mais ne sont pas accessibles en raison des jonctions serrées présentes entre les cellules. Un essai clinique de thérapie génique à l'aide d'un adénovirus administré par aérosol avait démontré qu'avec des doses relativement faibles, l'expression du transgène CFTR restait détectable sans qu'il y ait eu modification de l'état inflammatoire ou immunologique [334]. Par la suite, la faisabilité des administrations répétées d'adénovirus CFTR a été évaluée dans plusieurs essais cliniques [331,335]. Au total, une dizaine de protocoles cliniques de thérapie génique de la mucoviscidose à l'aide des vecteurs dérivés des adénovirus ont ainsi été effectués depuis 1993. Globalement, ces études cliniques ont montré que : (a) sur le plan moléculaire (ARNm, protéine) l'expression du transgène CFTR était détectable, (b) la mesure de la DDP nasale met en évidence une correction partielle du transport des ions chlorures parfois, (c) l'état inflammatoire pulmonaire était dose-dépendante et (d) l'efficacité du transfert diminuait lors des administrations répétées [331,336,337]. Pour contourner les inconvénients rencontrés avec ces virus, des vecteurs de nouvelles générations ont été développés, particulièrement les virus « **gutless** » dépourvus de ses gènes viraux, ce qui devrait diminuer la réponse immunitaire [336], ou encore des vecteurs capables de cibler d'autres récepteurs que le récepteur commun CAR, ce qui permettrait de transduire les cellules par leur pôle apical. Une étude a démontré que la transduction des cellules par leur pôle apical pourrait diminuer la toxicité des vecteurs dérivés des adénovirus [338]. Une autre approche envisagée pour limiter la réponse immunitaire humorale vis-à-vis des protéines de la capsid virale est de rendre les virus furtifs (stealth virus) invisibles pour le système immunitaire, à l'aide d'un recouvrement adéquat ; la pégylation [336]. La pégylation a permis de réduire la réponse cytotoxique des cellules T et la production des anticorps contre les particules virales, et par conséquent l'expression du transgène a été prolongée de façon significative de 4 à 42 jours après administration [336]. Cependant, l'administration répétée de l'adénovirus pégylé n'a pas réussi.

4.1.2 Les adénovirus associés

Les vecteurs dérivés des virus adéno-associés (AAV) ont été développés comme alternative aux vecteurs adénovirus. Les AAV sont de petits virus d'un diamètre d'environ 20 à 25 nm à ADN simple brin, appartenant à la famille des parvovirus. En raison de leurs

Chapitre II : Thérapie Génique

propriétés multiples telles que l'existence de nombreux sérotypes et un large tropisme, la longue durée de l'expression du transgène, la bonne tolérance et l'absence de pathogénicité chez l'homme et le fait qu'ils soient peu immunogènes, les AAV ont suscité beaucoup d'intérêt pour le transfert de gènes [336]. Les limites des AAV sont la taille limitée du gène à transférer, l'inefficacité à traverser la membrane apicale des cellules épithéliales et la réponse immunitaire antivirale induite suite aux administrations répétées [336,337,339]. Environ 12 sérotypes humains ont été identifiés, mais c'est le sérotype 2 (AAV2) qui est le plus étudié et le plus utilisé pour l'instant [8,336].

Durant la dernière décennie, une demi-douzaine de protocoles cliniques de thérapie génique de la mucoviscidose, ont été réalisés en utilisant le vecteur AAV2 TgAAV-CFTR (Targeted Genetics Corp), qui utilise un promoteur faible de la région terminale LTR (Long Terminal Repeat Sequences) du AAV pour induire l'expression du transgène [336]. Les essais initiaux de phase I ont montré la bonne tolérance de ces vecteurs et ont rapporté quelques résultats encourageants, comme une légère amélioration des fonctions respiratoires, une diminution de l'IL-8 dans les expectorations et une augmentation de la cytokine anti-inflammatoire l'IL-10 [318,340–342]. Cependant, l'essai clinique de phase II de réadministrations par aérosol sur une plus grande cohorte (100 patients) n'a montré aucune amélioration statistiquement significative de la fonction respiratoire, et les espoirs initiaux n'ont pas pu donc être confirmés [317]. Le développement d'une réponse immunitaire antivirale ainsi qu'une trop faible efficacité des AAV2 à transduire via le pôle apical, et le fait que le promoteur LTR utilisé pour entraîner l'expression du transgène est trop faible, pourraient être à l'origine de ces résultats négatifs. Les recherches visant à résoudre les limites des AAV et d'améliorer leur efficacité ne cessent de progresser. Pour cela, des AAV2 contenant des capsides de sérotypes 1, 5, 6, et 9 ont été développés, et semblent être plus efficaces, dans la transduction des cellules épithéliales des voies aériennes par rapport aux AAV2 classiques [343,344]. L'usage des AAV est souvent limitée par l'absence des récepteurs HSPG (Heparan Sulfate Proteo Glycan) spécifiques de ces virus à la surface des cellules cibles [345]. Ainsi, des régions spécifiques ont été identifiées au niveau des protéines de la capside, et qui peuvent servir pour l'insertion de petits peptides exogènes [345]. Shi et al. ont démontré que l'incorporation d'une séquence contenant le peptide RGD (Arg-Gly-Asp) permet aux AAV de transduire efficacement les cellules exprimant des intégrines, indépendamment des récepteurs HSPG [345]. Ils ont également démontré qu'en raison du large tropisme des AAV (muscle (AAV8, AAV9), la rétine (AAV2)), ces nouveaux vecteurs sont capables de transduire de manière efficace des tumeurs in vivo résistantes aux AAV2, ceci suggère que ces vecteurs

Chapitre II : Thérapie Génique

peuvent offrir des avantages thérapeutiques considérables [345]. White et al. ont génétiquement modifié la capsid des AAV2, en incorporant des ligands peptidiques (ex. THALWHT,...) ayant une haute affinité pour l'épithélium respiratoire humain au niveau de la région en boucle des protéines de la capsid [346]. Ils ont démontré, que le nouveau vecteur AAV2 contenant la séquence peptidique THALWHT au niveau des protéines de la capsid permet une forte transduction dans les cellules épithéliales indifférenciées des voies aériennes humaines, mais également dans les cellules polarisées [346]. Point important, ce nouveau vecteur a pu transduire les cellules indépendamment du récepteur HSPG [346]. L'incorporation de ces ligands sur d'autres sérotypes d'AAV, ayant déjà montré des efficacités intéressantes sur le transfert de gènes dans l'épithélium respiratoire humain, pourrait améliorer l'utilisation et l'application des AAV dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose. D'autres stratégies visant à surmonter les difficultés d'encapsidation de grandes séquences d'ADN par les AAV ont été mises au point, comme par exemple des approches de trans-épissage [347], ou de recombinaison homologue [348]. Le principe élémentaire de ces approches consiste à scinder un grand gène en deux parties, puis à cloner chaque partie dans deux vecteurs distincts, et les introduire simultanément dans la cellule cible. La partie 5' de l'ADNc est clonée dans un vecteur, en aval d'un promoteur choisi, et en amont d'un site accepteur d'épissage, tandis que la partie 3' est clonée dans un autre vecteur, en aval d'un site accepteur d'épissage. La concatémérisation entraîne la formation d'hétérodimères, et la transcription produit ainsi des pré-ARNm dont la maturation par épissage assemble les deux parties et élimine les parties terminales du vecteur aboutissant ainsi à l'expression de longs transgènes [347,349–351], tel que le CFTR [352]. Ces nouvelles techniques n'affectent pas les propriétés transfectantes du vecteur. Ainsi, Halbert et al. ont démontré que le vecteur de recombinaison AAV2/6 (ITR (Inverted Terminal Repeat Sequence) du AAV2 et la capsid du AAV6) est aussi efficace dans la transduction des cellules pulmonaires de souris que le virus non modifié [348]. Toujours dans l'optique de surmonter les limites de transport des AAV, d'autres stratégies consistant à raccourcir la taille de l'ADNc des gènes, notamment pour le CFTR ont été développées. Ostedgaard et al. ont montré que l'ADNc CFTR dont une partie du domaine R a été supprimée conduit à une correction partielle du transport des ions chlorés *in vitro* [353]. Une autre étude a établi la preuve de principe qu'un rAAV2/5 portant un ADNc CFTR tronqué produit des ARNm spécifiques du vecteur et permet l'expression de la protéine CFTR chez des primates non humains [7]. Par la suite, Mueller et al. a montré que ce vecteur (rAAV5-CFTR tronqué) induit une correction partielle de l'allergie à l'aspergillose broncho-pulmonaire (ABPA :

Chapitre II : Thérapie Génique

Allergic Broncho Pulmonary Aspergillosis), un phénotype clinique qui se produit sur un modèle murin $cf^{-/-}$ [354]. Le type de promoteur a également toute son importance dans l'efficacité de transduction des AAV. Dans ce contexte, une étude avait montré que le vecteur AAV2/5 contenant le promoteur hybride constitué d'un enhancer CMV, d'un promoteur et d'un site donneur d'épissage de la β – actine, et d'un site accepteur de l'épissage (promoteur CAG) de la β – globine était plus efficace et aboutissait à une transduction de 90% des cellules des voies aériennes de souris [355]. Concernant la réponse immunitaire, elle pourrait être théoriquement limitée par l'utilisation de vecteurs dépourvus de capsides.

Cependant, il est difficile de conclure de façon ferme sur la faisabilité des réadministrations des vecteurs AAV chez l'homme. En effet, les résultats précliniques sont très variables, en fonction du modèle animal, de la voie d'administration, du sérotype AAV [356–359], de la dose, de la fréquence des administrations, et de l'utilisation ou non d'un traitement immunosuppresseur [336].

4.1.3 Les rétrovirus

Les rétrovirus sont des virus enveloppés, avec un diamètre de 110 à 125 nm, dont le patrimoine génétique est un ARN à double brin homologue, rétro-transcrit en ADNc lors du cycle infectieux. Ils ont été les premiers virus utilisés comme vecteurs de transfert de gènes [360]. Les plus couramment utilisés dérivent des rétrovirus de la leucémie murine, plus particulièrement du virus de Moloney (Mo-MLV) [361]. Les vecteurs développés à partir de ces virus sont dépourvus des séquences gag, pol et env essentielles à la réplication virale, seules les séquences LTRs nécessaires à leur intégration dans les chromosomes, et la séquence ψ permettant l'encapsidation sont conservées. Les rétrovirus sont capables de transduire un grand nombre de cellules cibles, puisque les protéines de l'enveloppe virale sont capables de se lier à de nombreux récepteurs présents à la surface de nombreux types cellulaires. Ainsi, le nouveau gène transféré se transmet depuis la cellule mère aux générations successives de cellules filles de façon égale, permettant ainsi une expression stable du gène d'intérêt à long terme. Cependant, ces vecteurs rétroviraux ne peuvent pas infecter les cellules quiescentes (cellules musculaires, neurones, cellules de l'épithélium respiratoire, ...). Cette particularité limite donc leur utilisation en thérapie génique, étant donné que les cellules cibles du transfert de gènes sont le plus souvent des cellules qui ne se divisent pas ou peu. Parmi les autres freins à leur usage, la taille limitée de la séquence à transférer (≤ 8 kb), le manque de spécificité et le risque de mutation insertionnelle [362,363]. Ceci dernier point peut conduire à l'activation d'oncogènes, causant le dysfonctionnement du

Chapitre II : Thérapie Génique

cycle cellulaire, comme ce fut le cas des « bébés bulles » ayant développés des leucémies [364]. En raison de tous ces inconvénients, l'utilisation des vecteurs dérivés des rétrovirus est contournée à la thérapie génique ex vivo. Des vecteurs rétroviraux hybrides appelés « virus pseudotypés » et contenant l'enveloppe d'un autre virus reconnue de façon spécifique par les cellules cibles, ont ainsi été mis au point pour tenter d'améliorer la spécificité de ces vecteurs pour un type cellulaire [365,366]. Une autre approche consiste à greffer un ligand particulier spécifique des cellules cibles, au niveau des protéines de l'enveloppe virale responsables de la liaison aux récepteurs cellulaires [367]. Une autre alternative aux rétrovirus est l'utilisation des lentivirus. Il faut noter que les rétrovirus n'ont pas été utilisés dans la mucoviscidose.

4.1.4 Les lentivirus

Les lentivirus (ex. HIV : Human Immunodeficiency Virus), une sous famille des rétrovirus, ont récemment été envisagés comme alternative aux vecteurs rétroviraux pour diverses applications qui reposent sur le transfert de gènes. À la différence des rétrovirus, les lentivirus sont capables de transduire des cellules qui ne se divisent pas (cellules souches, pulmonaires, hépatiques, musculaires, neurones, ...) et des cellules en division [368], ce qui fait d'eux des vecteurs appropriés pour la transduction des cellules différenciées des voies aériennes, et notamment dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose [369,370]. Par ailleurs, ils s'intègrent dans le génome de la cellule infectée. La plupart des vecteurs lentiviraux sont dérivés du virus HIV, mais également du virus SIV (Simian Immunodeficiency Virus). Les vecteurs lentiviraux ont démontré une efficacité clinique significative chez les personnes atteintes du syndrome de Wiskott-aldrich [371], et de la leucodystrophie métachromatique [372]. De plus, un essai chez des patients atteints de la maladie de Parkinson, a démontré l'innocuité à long terme et la tolérance de l'injection directe du vecteur dans le cerveau [373]. Ces vecteurs n'ont cependant pas un tropisme naturel pour l'épithélium pulmonaire. Ainsi dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose, ceci a amené à développer des vecteurs lentiviraux pseudotypés par des protéines d'enveloppe appropriées capables d'interagir avec la surface apicale des cellules épithéliales respiratoires pour réaliser une transduction efficace [374,375]. La protéine d'enveloppe du virus VSVG (Vesicular Stomatitis Virus G), qui est largement utilisée ne transduit pas efficacement les cellules épithéliales des voies aériennes via le pôle apical, mais cette efficacité peut être améliorée par une pré-administration de molécules (ex. Lysophosphatidylcholine 'LPD') entraînant l'ouverture des jonctions serrées, permettant au vecteur lentiviral d'accéder à la membrane basolatérale des cellules cibles [376]. Toutefois, il est actuellement impossible de

Chapitre II : Thérapie Génique

savoir si l'ouverture des jonctions serrées dans les poumons infectés par des bactéries est sans risque pour le patient [370]. Ainsi, d'autres protéines d'enveloppes virales ont été testées, pour créer de nouveaux vecteurs lentiviraux pseudotypés, citons l'hémagglutinine du virus influenza (HA) [377], et la glycoprotéine gp64 du baculovirus [378]. Les vecteurs dérivés des lentivirus ayant comme protéines d'enveloppe les protéines F/NH du virus Sendai, un virus extrêmement efficace pour infecter les cellules épithéliales respiratoires de façon transitoire [379,380], se sont montrés efficaces pour la transduction des cellules épithéliales des voies respiratoires (environ 5% de cellules ciliées transduites *in vivo* chez les souris). Une administration unique a suffi pour induire une expression soutenue du transgène durant la durée entière de la vie de la souris [323,381–383]. Cette expression durable pourrait être liée à la transduction de cellules souches pulmonaires, ou à une durée de vie des cellules épithéliales respiratoires plus longue que celle classiquement référencée [383], pouvant aller jusqu'à 17 mois environ [384]. L'efficacité des vecteurs lentiviraux est conservée lors des administrations répétées, ce qui explique que ces vecteurs sont capables d'échapper à la réponse immunitaire adaptative, sans que l'on comprenne clairement comment cela est possible sur le plan immunologique [385]. Le consortium britannique de thérapie génique de la mucoviscidose prévoit de lancer un essai clinique en 2017, visant à établir une étude complète et formelle sur la sécurité de l'utilisation des vecteurs lentiviraux pseudotypés au niveau de l'épithélium respiratoire et sur leurs potentiels effets toxiques [322]. Ces qualités uniques font des vecteurs lentiviraux des candidats attractifs pour la thérapie génique de la mucoviscidose. Cependant, certains obstacles liés aux problèmes de production à grande échelle et à la sécurité d'emploi de ce type de vecteurs intégratifs restent à identifier et à surmonter.

4.1.5 Conclusion

Les vecteurs viraux sont certes très efficaces pour le transfert de gènes, en termes de délivrance mais aussi d'expression, mais présentent de sévères inconvénients que la recherche essaye de surmonter. Notamment, la taille de la séquence génique à transférer est limitée, les fortes réactions immunitaires et inflammatoires observées qui empêchent les réadministrations nécessaires pour le maintien de l'expression, la pathogénicité due à des mutations insertionnelles. De plus, leur production à grande échelle est très difficile et coûteuse. Les vecteurs lentiviraux, contrairement aux adénovirus et AAV recombinants, semblent prometteurs, et paraissent relativement peu immunogènes et efficaces à long terme même lors des administrations répétées. Cependant, les lentivirus recombinants n'ont pas encore été

Chapitre II : Thérapie Génique

évalués chez des patients mucoviscidosiques. Ce sont les essais cliniques futurs donc qui vont confirmer ou infirmer les espoirs placés en eux. C'est pour palier aux limites des vecteurs recombinants viraux que les vecteurs synthétiques ont été envisagés comme alternative.

4.2 Les approches non virales

Comme alternative aux vecteurs viraux, de nouvelles techniques de transfert de gènes dites non-virales se sont développées. Ces approches se déclinent en deux catégories principales, les méthodes physiques et chimiques.

4.2.1 Approches physiques

De nombreuses méthodes physiques ont été développées pour favoriser le transfert de gènes dans un organe cible ou dans l'organisme entier (Figure 15).

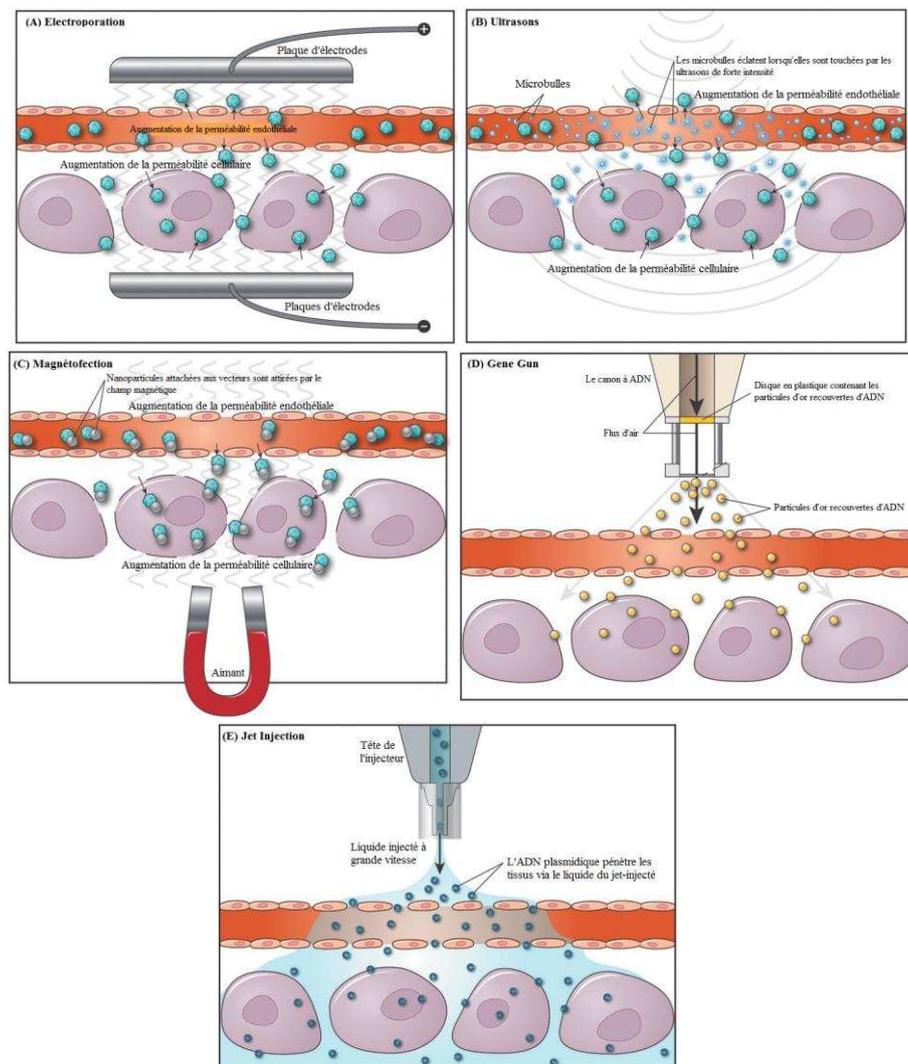


Figure 15 : Principales méthodes physiques de transfert de gènes ; (A) électroporation, (B) Ultrasons (sonoporation), (C) magnétofection, (D) Gene Gun et (E) Jet injection (modifiée d'après [386]).

4.2.1.1 ADN nu

L'injection directe de l'ADN thérapeutique nu dans un tissu cible est la technique la plus simple de transfert de gènes, utilisée dans environ 17.4% des essais cliniques (Figure 14). Cette approche s'est montrée efficace, particulièrement pour le transfert d'acides nucléiques dans la peau [387], et dans le muscle [388–391]. Cependant, la quantité d'ADN internalisée dans les cellules est trop faible et l'expression reste localisée au niveau du site d'injection. De plus cette approche reste limitée aux organes relativement accessibles comme la peau et le muscle des membres. L'administration systémique n'est pas envisageable, puisque l'ADN nu serait alors très rapidement dégradé par les protéines du sérum [392], et sa demi-vie plasmatique est très courte [393]. En revanche, la vaccination constitue une des applications majeures de l'injection d'ADN nu. En effet, depuis les années 90, il a été rapporté dans de nombreux modèles animaux de cancer ou de maladies infectieuses, que l'injection directe de l'ADN nu dans le muscle ou la peau aboutissait à la production d'antigènes protéiques in situ et à l'induction d'une réponse immunitaire protectrice [394–396]. De plus, l'ADN nu ne provoque pas de réponse immunitaire spécifique, seule la présence des motifs CpG non méthylés sur l'ADN plasmidique favorise la réaction inflammatoire et immunitaire [396]. Ceci pourrait être bénéfique pour la thérapie vaccinale. Cependant, les risques de dégradation par les DNAsés présentes dans le sérum et d'élimination par le système de phagocytes mononucléés (MPS) subsistent et limitent par conséquent, les champs d'application de l'approche par l'injection directe d'ADN nu.

L'injection hydrodynamique consiste en l'injection rapide d'un grand volume d'une solution isotonique d'ADN dans la circulation systémique, via la veine caudale de souris et/ou de rats [397–399]. Une expression du transgène a été détectée au niveau hépatique suite à une injection hydrodynamique [400]. Ceci est en fait la conséquence de l'accumulation du bolus en excès au niveau de la veine cave inférieure [400], qui induit par surpression la perméabilisation de l'endothélium des capillaires et des hépatocytes, permettant ainsi le passage de l'ADN [400,401]. Une autre approche qui consiste en une injection hydrodynamique dans la veine saphène de souris (HLV : Hydrodynamic Injection saphenous Vein) sous pression tout en bloquant la circulation sanguine avoisinante [402], a donné lieu à des résultats similaires avec 10 à 40 % de cellules musculaires transfectées [402,403]. Ce mode d'administration est sûr et des administrations répétées peuvent être réalisées sans risque d'induire des conséquences graves [400,404]. HLV a été utilisée pour délivrer l'ADNp codant pour la dystrophine chez les souris mdx, donnant lieu à une amélioration de la fonction musculaire [405]. Cette voie d'administration a également été évaluée chez les chiens [406],

Chapitre II : Thérapie Génique

les primates non humains [407], et les personnes atteintes de dystrophie musculaire [408]. Afin de réduire les variabilités liées à l'expérimentateur et ainsi standardiser le protocole, un dispositif d'injection contrôlée par ordinateur a été mis au point [409].

4.2.1.2 Le canon à ADN

Le canon à ADN ou « Gene Gun » ou encore biolistique fut utilisé pour la première fois sur cellules végétales en 1987 (Figure 15) [410], puis étendue aux cellules et tissus de mammifères [411,412]. Cette technique consiste à bombarder un tissu cible à l'aide d'un canon à ADN avec des particules métalliques inertes, essentiellement d'or ou de tungstène, d'environ 1µm de diamètre, recouvertes d'ADN. Ces particules sont propulsées à l'aide d'un gaz (hélium) dans les cellules et/ou tissus cibles permettant ainsi l'entrée directe de l'ADN dans le cytoplasme des cellules cibles. Lee et al. ont démontré que les nanoparticules de chitosan en combinaison avec l'approche de « gene gun » donnent des résultats similaires aux particules métalliques [413]. Ces nanoparticules de chitosan pourraient donc être utilisées comme alternative à l'utilisation et à l'introduction des métaux non-biodégradables dans l'organisme. Néanmoins, la principale utilisation de cette technique est l'immunisation génétique au niveau de la peau [414].

4.2.1.3 Le jet injection

Le jet injection est un mode d'administration locale de molécules d'intérêt, sans recours à une aiguille (Figure 15). Cette technique est essentiellement utilisée pour la délivrance d'hormones, d'insuline [415], pour l'immunisation [416], et pour les anesthésiants locaux [417,418]. Lors d'un jet injection pour le transfert de gènes, la solution d'acides nucléiques est délivré sous forme d'un jet à haute pression sur les cellules et/ou tissus cibles, permettant ainsi l'introduction de l'ADN d'intérêt dans les cellules cibles. Ainsi, cette technique a été évaluée dans le cadre de transfert de gènes pour le cancer de côlon [419,420], pour le mélanome et le cancer de sein [421], et pour l'immunisation génétique [422,423]. Des expériences de délivrance d'ADN associés à des particules polymériques par le jet injection ont également été menées [424]. Cependant, cette approche reste limitée aux organes accessibles comme la peau, et semble difficilement applicable aux organes profonds tel que le poumon.

4.2.1.4 La sonoporation

Consiste à appliquer des ultrasons pour perméabiliser les membranes des cellules et ainsi augmenter le trafic intracellulaire des molécules d'intérêt (Figure 15). L'ADN nu est en général co-injecté avec des microbulles de 1 à 3 µm de diamètre, constituées de protéines, de

Chapitre II : Thérapie Génique

lipides ou de polymères, et remplies d'air ou d'un gaz inerte. On peut citer à titre d'exemple, les microbulles Optison™ (GE Healthcare) composées de perfluoropropane, encapsulées dans une sphère d'albumine humaine. Le premier résultat de transfert de gènes par sonoporation a dans les cellules de mammifères, a été décrit dans les années 90 [425]. Depuis, cette approche s'est montrée efficace sur une grande variété de tissus tels que le muscle squelettique [390,426,427], les tumeurs solides [428,429], et les cellules neuronales [430], mais également dans des organes profonds comme le cœur et le pancréas après administration systémique d'ADN d'intérêt [431,432]. Cependant, le mécanisme de la sonoporation n'est pas entièrement élucidé, mais pourrait être expliqué par le phénomène dit de « cavitation acoustique » [433]. En effet, la propagation d'ultrasons dans un liquide crée des phases de compression et de dépression d'un élément de liquide. Si l'amplitude de la phase dépressionnaire est suffisamment grande, des bulles se forment au sein même de la phase liquide, pour croître et finalement imploser : c'est la cavitation acoustique. Cette dernière entraîne donc une perturbation mécanique associée à une libération d'énergie, qui pourrait perméabiliser les membranes des cellules avoisinantes. Le niveau de perméabilisation des membranes cellulaires dépend de la fréquence et de l'intensité des ultrasons, et aussi de la durée d'exposition [434]. L'ajout de microbulles lors du transfert d'acides nucléiques permet d'augmenter les sources de cavitation, la destruction de chaque microbulle induit une réaction en cascade de cavitation [435].

4.2.1.5 L'électroporation

L'électroporation ou électrotransfert consiste à appliquer de courtes impulsions d'un champ électrique au niveau du tissu cible après injection de l'ADN, pour induire une électroperméabilisation transitoire des membranes cellulaires, et permettre l'entrée d'ADN ou d'autres molécules dans les cellules cibles (Figure 15). Cette approche est utilisée depuis 1982 [436], sur modèles cellulaires [437] et animaux, principalement dans le cadre de transfert du gènes appliqué au mélanome [438], ou dans une approche de vaccination [439]. Elle a également été évaluée in vivo pour le transfert d'ADN à destination de l'épithélium pulmonaire, donnant lieu à une expression du gène rapporteur 100 fois plus importante qu'après administration d'ADN nu [440].

4.2.1.6 La magnétofection

La magnétofection est basée sur l'utilisation d'un puissant champ magnétique, qui permet l'accumulation d'acides nucléiques associés à des nanoparticules supramagnétiques à base d'oxyde de fer sur les membranes cellulaires cibles (Figure 15). Cette technique a également

Chapitre II : Thérapie Génique

été utilisée en combinaison avec des vecteurs viraux et synthétiques dans des essais menés in vitro et in vivo [441,442]. Les nanoparticules magnétiques se sont avérées sûres et efficaces pour la transfection des astrocytes de rats, qui survivent et se différencient ensuite en tissu neuronal en 3 dimensions [443]. Ces astrocytes transfectés pourraient former la base d'une « nanoplatforme multifonctionnelle » dans le cadre de la transplantation de cellules neuronales [443]. Il a été également démontré que les particules magnétiques offrent une alternative simple et efficace aux vecteurs viraux, dans le cadre de transfert de gènes dans les cellules souches neuronales en neurobiologie et la recherche en transplantation des neurones [444]. La magnétofection a attiré l'attention de nombreux chercheurs travaillant avec des systèmes nanoparticulaires. Des systèmes d'administration sous forme d'aérosol ont été développés, appelés magnétosols, pour améliorer le ciblage des gènes délivrer à destination du poumon [445]. Les magnétosols sont des aérosols magnétisés constitués de gouttelettes contenant un complexe de transfert de gènes (fluorescéine ou ADNp complexé) et des nanoparticules supramagnétiques d'oxyde de fer (SPIONs), et sont guidés par un gradient de champ magnétique externe [445]. Les magnétosols constitués par des complexes PEI-ADNp et SPIONs ont été aérosolisés dans les poumons des souris. Les résultats obtenus ont démontré une accumulation 2 à 3 fois plus élevée de la fluorescéine et de l'expression spécifique d'un transgène dans les régions pulmonaires de souris qui avaient été exposées à un gradient magnétique externe au cours de la nébulisation par rapport aux souris témoins sans aucune exposition à champ magnétique [445]. En conclusion, les résultats de cette étude apportent la preuve de concept de la possibilité de ciblage magnétique des médicaments dans les poumons pour le traitement d'une variété de maladies pulmonaires. L'utilisation des nanomagnétosols pourrait améliorer la thérapie par aérosol, en diminuant les effets secondaires nocifs et en augmentant l'efficacité du traitement des médicaments.

4.2.2 Approches chimiques

Comme nous l'avons évoqué plus haut, les vecteurs viraux bien qu'ils soient efficaces souffrent d'inconvénients majeurs. Quant aux méthodes physiques elles sont pour la plupart difficilement applicables aux organes profonds. Les recherches se sont donc orientées vers la mise au point de nouvelles méthodes chimiques. Les approches chimiques sont basées sur des vecteurs synthétiques obtenus par synthèse organique. Il s'agit essentiellement de molécules cationiques capables d'interagir électrostatiquement avec les charges négatives portées par les phosphates des acides nucléiques. Les complexes (vecteur/acides nucléiques) ainsi formés, peuvent être internalisés par les cellules. L'acide nucléique (plasmide) comporte une cassette

Chapitre II : Thérapie Génique

d'expression eucaryote du transgène, est libéré dans le cytoplasme des cellules cibles pour être transcrit dans le noyau [446]. De façon très générale, par rapport aux vecteurs viraux, les avantages potentiels des vecteurs synthétiques sont multiples. Ainsi, la taille du gène à transférer n'est pas limitée, point important pour la thérapie génique de la mucoviscidose puisque la taille du plasmide codant pour le gène CFTR est d'environ 8kb. La facilité de production à grande échelle à moindre cout est possible. La faible toxicité et surtout l'absence d'immunogénicité des vecteurs constituent des atouts importants. Ce dernier point étant capital quand des administrations répétées sont envisagées. Cependant, bien qu'il soit difficile de mener des études comparatives entre les vecteurs viraux et les vecteurs chimiques, les études précliniques réalisées jusqu'à présent ont montré que les vecteurs synthétiques en général demeurent moins efficaces que les vecteurs dérivées des virus. De plus, il est souvent très difficile voire impossible d'extrapoler les résultats obtenus *in vitro* aux données obtenues *in vivo*, et à fortiori à la clinique. Ceci est dû notamment aux obstacles cellulaires rencontrés par les vecteurs, leur trafic intracellulaire dans les milieux biologiques, et aussi à l'absence de motifs spécifiques pouvant faciliter l'entrée dans la cellule, aider à l'échappement endosomal, à la migration dans le cytoplasme et à l'entrée dans le noyau afin d'y être transcrit. Au fil de leur évolution, les virus ont naturellement développés des stratégies efficaces pour surmonter chacune des étapes du trafic intracellulaire. Barrières mises en place par l'organisme pour se protéger de ces séquences exogènes. Par ailleurs, la nature de la séquence nucléique transportée a toute son importance. Celle-ci a d'ailleurs longtemps été négligée, mais des progrès importants ont récemment été réalisés en ce qui concerne le design du plasmide transféré, et notamment pour la mucoviscidose [447]. Ceci concerne à la fois sa partie eucaryote que sa partie procaryote.

Une multitude de vecteurs non-viraux incluant plusieurs types de lipides cationiques et de polymères cationiques ont été développés, certains ayant d'ores et déjà été évalués lors d'essais cliniques (ex. GL67A [321]). Les vecteurs cationiques sont capables de s'associer par interactions électrostatiques avec les phosphates anioniques des acides nucléiques, le compacter, et engendrer des complexes plus ou moins homogènes appelés lipoplexes (ADN/liposomes), polyplexes (ADN/polymère) ou lipopolyplexes (ADN/polymère/liposomes). En fonction de la quantité de vecteur utilisée par rapport à la masse d'ADN, les complexes formés sont de charge globale positive, négative ou neutre. Par ailleurs, il est réellement difficile de comparer les différents vecteurs entre eux, en raison de nombreux paramètres qui varient entre les études (la structure chimique du vecteur, formulation des systèmes vecteur/acides nucléiques, modèles cellulaires et animaux utilisés ainsi que le mode

Chapitre II : Thérapie Génique

d'administration). Tous ces éléments ont vraisemblablement une forte incidence sur l'efficacité finale et la toxicité des vecteurs. Le challenge des vecteurs synthétiques est donc d'acquies les propriétés structurales qui leur permettront de résister et de surmonter les différentes barrières extra- et intracellulaires auxquelles ils sont confrontés, pour y délivrer efficacement le gène d'intérêt. Un vecteur idéal doit ainsi répondre à de nombreux critères, que sont :

- Interagir et former des complexes nanométriques avec les acides nucléiques à transférer
- Protéger les acides nucléiques de tout risque de dégradation depuis le site d'injection jusqu'aux noyaux des cellules cibles
- Être tissu ou cellules-spécifiques; c'est-à-dire faciliter la fixation des complexes (ADN/vecteur) sur les membranes des cellules cibles, aidant ainsi à leur internalisation
- Faciliter l'échappement endosomal
- Permettre le trafic intracellulaire de l'ADN, la migration dans le cytoplasme et aider à l'entrée dans le noyau
- Ce vecteur doit donc allier efficacité, sécurité et innocuité pour le tissu cible

Afin de répondre à ces exigences, le développement de vecteurs non-viraux n'a cessé d'évoluer au cours de ces dernières années. Les principes actifs que constituent les acides nucléiques ont d'abord été utilisés seuls, puis incorporés dans divers systèmes de délivrance de gènes comme les vecteurs dérivés des virus et les vecteurs chimiques. Par la suite, différents composés (ex. PEG, DOPE, les motifs imidazoles,...etc.) ont été rajoutés aux formulations pour apporter des caractéristiques nouvelles, comme aider la construction d'acide nucléique à échapper au système immunitaire, favoriser et améliorer l'échappement endosomal, apporter de la furtivité et enfin, augmenter l'efficacité de transfection des complexes [6]. Pour favoriser le trafic nucléaire des acides nucléiques, des séquences d'ADN spécifiques reconnues par les facteurs de transcription NFkB ont également été insérées dans la séquence de la construction d'acide nucléique portant le gène d'intérêt [14]. Les recherches dans ce sens ne cessent de progresser, pour améliorer et optimiser aux mieux les nouvelles formulations, et augmenter leur efficacité de transfection tout en limitant leurs effets secondaires.

Les vecteurs synthétiques peuvent être classés en deux grandes catégories, les lipides cationiques et les polymères cationiques.

4.2.2.1 Les lipides cationiques

Le développement de vecteurs synthétiques destinés à compacter et à véhiculer les acides nucléiques a débuté dans les années 70. Il s'agissait essentiellement de liposomes dont la capacité de fusion avec les membranes cellulaires [448,449], ainsi que leur potentiel de délivrance de particules exogènes ont été démontrés dans plusieurs études [450–455]. La recherche de nouvelles formulations a conduit au développement du premier lipide cationique synthétique le DOTMA (Chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-Triméthyl ammonium) par Felgner et son équipe en 1987 [456]. Peu de temps après, en 1989, c'est l'équipe de J.P. Behr qui mettait au point un autre vecteur lipidique, une lipopolyamine appelée DOGS (Dioctadecylamine-Glycine-Spermine) [457]. Depuis, une multitude de lipides cationiques ont été développés. Il s'agit principalement de molécules amphiphiles qui d'un point de vue structural possèdent 3 parties, à savoir une tête polaire hydrophile, un bras espaceur de longueur variable et un domaine hydrophobe (Figure 16). C'est la tête cationique qui interagit avec l'ADN, car elle est souvent composée par des fonctions amines protonées. Ces interactions électrostatiques entraînent la formation d'un complexe supramoléculaire structuré (lipide cationique / ADN) appelé lipoplexe, pouvant interagir avec la membrane plasmique des cellules. Le bras espaceur (ou linker) permet de relier le domaine hydrophobe et la tête polaire. La nature et la taille de l'espaceur influent largement sur la stabilité et la biodégradabilité du vecteur. Divers types de liaisons (éther, amine, ester ou amide) ont été testées afin de déterminer laquelle permettrait d'augmenter le relargage d'acides nucléiques. Le linker peut également être utilisé comme support pour l'apport de nouvelles fonctions, afin d'améliorer la spécificité cellulaire et le trafic intracellulaire des lipoplexes. Le domaine hydrophobe quant à lui est en général composé soit de deux chaînes d'acides gras (saturées ou insaturées), soit d'un motif cholestérol. Ce domaine a un rôle dans l'assemblage supramoléculaire des complexes formés, mais également dans les interactions avec les membranes cellulaires.

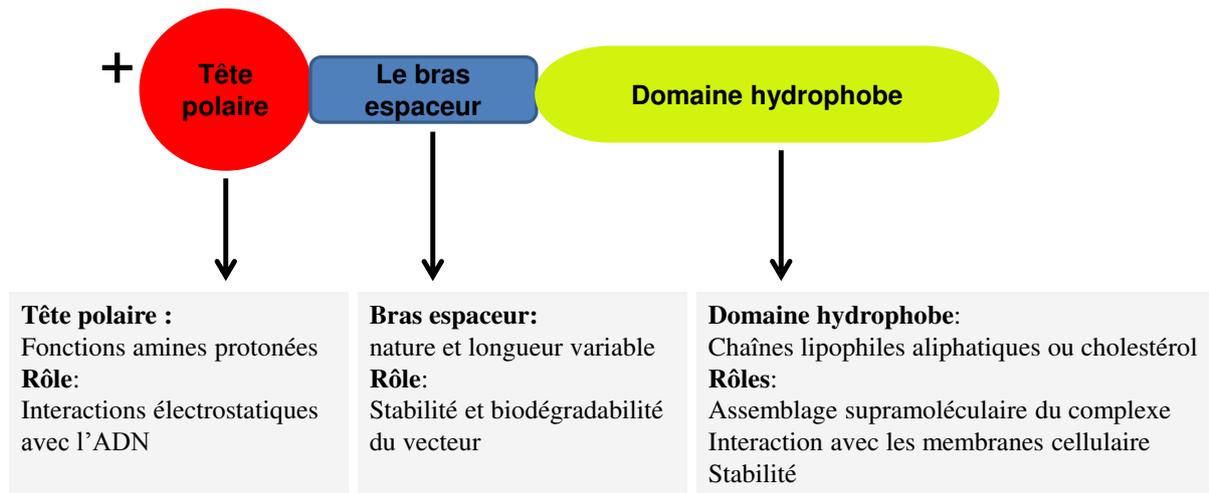


Figure 16 : Représentation schématique de la structure chimique des lipides cationiques

Les lipides cationiques peuvent être classés en 4 groupes principaux ; les lipides monocationiques, les lipides polycationiques et les dérivés du cholestérol qui eux-mêmes sont monocationiques ou polycationiques. Seuls les principaux exemples seront décrits ci dessous.

4.2.2.1.1 Les lipides monocationiques

Ainsi, le DOTMA fut le premier lipide monocationique développé par Felgner et al. en 1987 (Figure 17). Ce vecteur est caractérisé par une tête cationique de type ammonium quaternaire reliée par espaceur de type 2,3-propyl-di-oxy, à un domaine hydrophobe constitué de deux chaînes oléiques monoinsaturées [456]. Par la suite, de nombreux analogues du DOTMA furent synthétisés, en modulant la longueur des chaînes aliphatiques, et/ou la taille ou le type du bras espaceur. Ainsi, le DOTAP (méthylsulfate de N-[1-(2,3 dioleoyloxy) propyl]-(N, N, N triméthyl ammonium) (Figure 17) [458], où les fonctions éthers de l'espaceur sont remplacées par des fonctions esters, offrait une plus grande efficacité de transfection mais surtout une faible cytotoxicité par rapport au DOTMA [459]. Le remplacement de la fonction éther par une fonction ester moins stable, a donc probablement permis d'améliorer la biodégradabilité du lipide. Le DORIE (1,2-dioleoyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethylammonium bromide), qui diffère du DOTMA par la substitution d'un groupe méthyle par un groupe hydroxypropyle au niveau de l'amine quaternaire de la tête polaire, présentait une efficacité de transfection 2 à 3 fois supérieure à celle du DOTAP in vitro [460]. Des lipides monocationiques contenant des chaînes saturées furent également synthétisés comme le DMRIE (N-(2-hydroxyethyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyloxy-1-propanaminiumbromide) (Figure 17) [461]. Ce dernier associé à un lipide zwitterionique la DOPE (Figure 17) a permis d'augmenter d'un facteur de 1000 la quantité de complexes

Chapitre II : Thérapie Génique

(Lipide/ADN) administrée in vivo sans engendrer une toxicité [461]. L'ajout de la DOPE favorise la formation de phase hexagonale inverse, D'autres analogues portant des têtes cationiques de type pyridinium appelés SAINT (Synthetic Amphiphile INTeraction) (Figure 17) [462], où des têtes cationiques protonables dérivées de l'acide aminé l'alanine ont également été synthétisés.

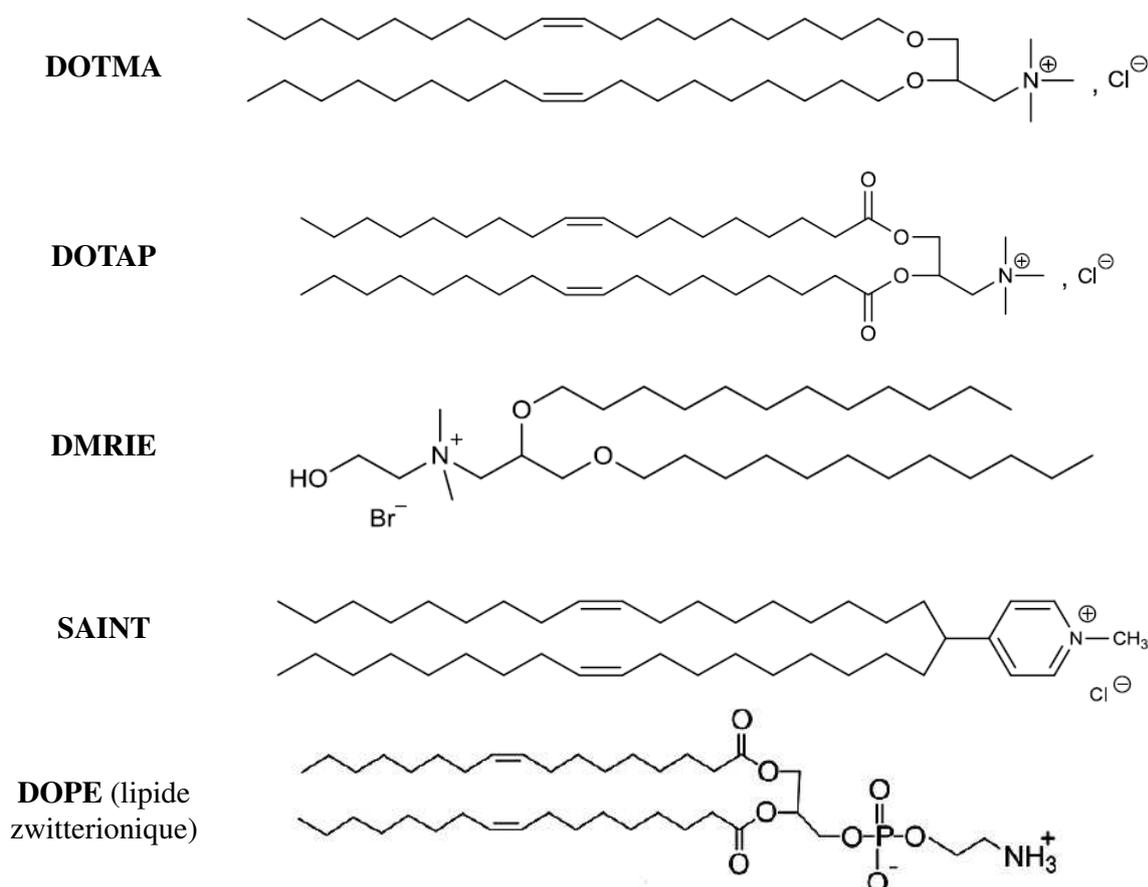


Figure 17 : Structure chimique des principaux lipides monocationiques et du lipide zwitterionique DOPE

Dans l'optique d'améliorer l'efficacité de transfection et de diminuer de la toxicité, une multitude de composés monocationiques possédant des modifications au niveau des trois domaines structuraux, ont depuis été mis au point et évalués dans le cadre de transfert de gènes.

4.2.2.1.2 Les lipides polycationiques

Les lipides polycationiques ont une plus forte densité de charge par rapport aux monocationiques, et permettent un transfert de gènes plus efficace que les vecteurs monocationiques. En effet, la liaison entre la partie hydrophobe et la polyamine de type

Chapitre II : Thérapie Génique

spermine est une liaison peptidique métabolisable, ce qui favorise la biodégradabilité du vecteur et donc une toxicité réduite. Le DOGS, une lipopolyamine dérivée de la spermine, fut le premier d'une longue série de lipides polycationiques à être synthétisé (Figure 18) [457]. Le DOGS s'est montré efficace pour le transfert de gènes même sans ajout de colipide (DOPE). Cependant les complexes (DOGS/DOPE) commercialisés sous le nom de Transfectam[®] (promega), offrent une meilleure efficacité sur lignées cellulaires. D'autres analogues ont également vu le jour par la suite, citons par exemple le DOSPA (2,3-dioleoyloxy-N-[2-(spermine-carboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanammonium trifluoroacetate) appelé Lipofectamine[™] lorsqu'il est mélangé avec la DOPE au rapport massique (3 :1) (Figure 18) [463].

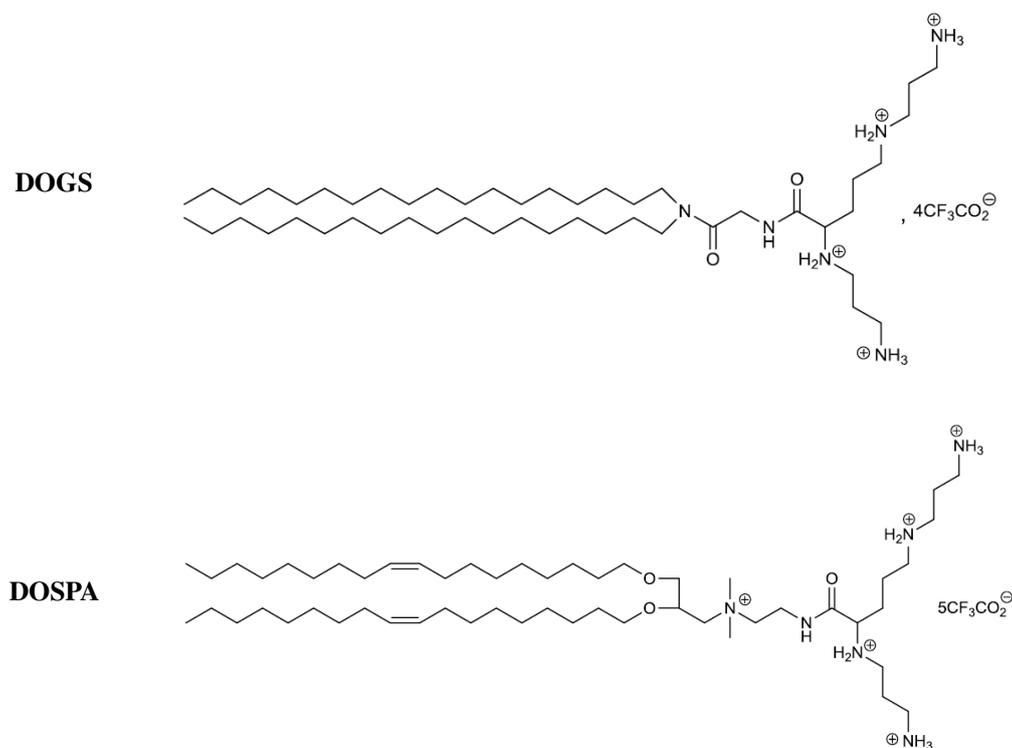


Figure 18 : Structure chimique des lipides polycationiques DOGS et DOSPA

4.2.2.1.3 Les dérivés du cholestérol

Le cholestérol à l'état naturel, le cholestérol est impliqué dans la rigidité membranaire. Il apporte de ce fait de nouvelles propriétés aux vecteurs cationiques [464]. Le premier lipide cationique dérivé du cholestérol décrit fut le DC-Chol (3-β-N-(N', N' diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol), dans les années 1990 par le Pr. Huang et son équipe (Figure 19) [465]. Son potentiel de délivrance de gènes a été démontré dans de nombreux types cellulaires avec une toxicité faible. Il a d'ailleurs été démontré que le DC-Chol associé à de la DOPE

Chapitre II : Thérapie Génique

était capable de transférer efficacement l'épithélium nasal des patients mucoviscidiques [466]. Cet essai a démontré que les vecteurs synthétiques peuvent être réadministrés par les voies aériennes avec succès sans perte apparente d'efficacité.

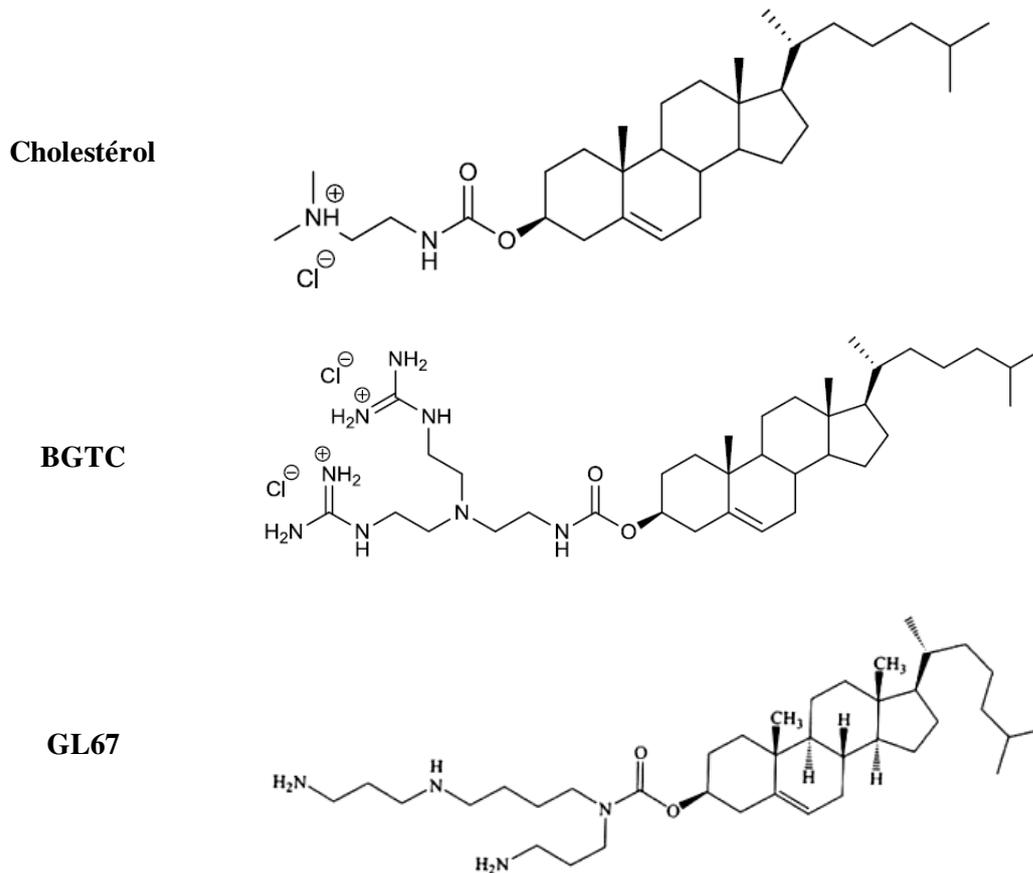


Figure 19 : Structure chimique des lipides cationiques dérivés du cholestérol (DC-Chol, BGTC et le GL67)

D'autres dérivés du cholestérol furent développés par la suite. À titre d'exemple, le BGTC (Bis(guanidinium)-tren-cholestérol), caractérisé par une tête polaire de type guanidinium qui favorise les interactions avec l'ADN (Figure 19) [467]. Il a été démontré que le BGTC transfère efficacement l'épithélium respiratoire de souris après administration intratrachéale [468], et celui de fœtus de mouton in utero [469]. Le BGTC en combinaison avec la DOPE présente un degré de stabilité suffisant pour permettre une délivrance efficace du transgène par voie d'aérosolisation [470]. Un autre dérivé de cholestérol mis au point est le GL67A (Figure 19) [471]. La formulation GL67A/pCFTR administré par aérosol induit une correction d'environ 25% du déficit de transport des ions chlorures, mise en évidence par mesure de la DDP transépithéliale au niveau des voies respiratoires inférieures [472]. Un grand nombre d'études précliniques, menées sur souris $cf^{-/-}$ [473], et chez la brebis [474] ont permis

Chapitre II : Thérapie Génique

d'identifier la formulation GL67A/DOPE/DMPE-PEG₅₀₀₀ (lipide cationique/lipide zwitterionique/stabilisateur stérique), comme étant la plus efficace parmi l'ensemble des vecteurs non-viraux disponibles pour un usage clinique [475]. De plus, après instillation nasale, le GL67A induit une expression du transgène (CFTR) localisée essentiellement au niveau des pneumocytes de type I de souris [476]. Ainsi, la formulation GL67A/DOPE/DMPE-PEG₅₀₀₀ complexé au plasmide pGM169 a récemment été évaluée dans un essai clinique de thérapie génique de la mucoviscidose en Grande Bretagne [321]. Le pGM169 est un plasmide totalement dépourvu des séquences CpG, où l'ADNc du CFTR humain est sous le contrôle transcriptionnel du promoteur hybride hCFEI (human cellular elongation factor I) [321]. L'administration mensuelle de la formulation (GL67A/pGM169) a été associée à une amélioration modeste de la FEV₁ en comparaison avec le groupe placebo. Une stabilisation de la fonction pulmonaire a été rapportée dans le groupe traité [321]. De plus, aucune différence significative n'a été enregistrée en terme d'effets indésirables entre le groupe traité et le groupe contrôle [321]. Ces résultats constituent une avancée majeure pour la thérapie génique non virale de la mucoviscidose, et encouragent à initier de nouveaux essais cliniques au moyen de vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes.

Notre groupe a participé activement au développement des composés originaux avec des têtes polaires différentes (phosphonium ou arsonium), des domaines hydrophobes divers (ex. chaînes phytanyles), ainsi que beaucoup d'autres lipides synthétiques. (Voir point 4.2.2.3 Lipides cationiques du laboratoire).

4.2.2.2 Les polymères cationiques

Les polymères cationiques constituent la seconde grande famille des vecteurs synthétiques. Ils sont composés de polymères portant plusieurs charges positives permettant ainsi une meilleure condensation des acides nucléiques. Les polymères cationiques sont représentés par quatre grandes familles de composés : la polyéthylèneimine (PEI), la poly-L-lysine (PLL), les dendrimères et le chitosan. Seules les plus couramment utilisés, qui sont la PEI et la PLL seront décrites.

4.2.2.2.1 Les dérivés de la polyéthylèneimine

La PEI est un polymère à haute densité de charges positives capables de condenser efficacement les acides nucléiques. Il fut utilisé pour la première fois pour le transfert de gènes par J.-P. Behr et son équipe dans les années 1990 [477], puis commercialisé sous les noms de Jet PEI et d'ExGen500 [478]. Les complexes formés, appelés polyplexes, sont très efficaces pour délivrer des gènes aussi bien dans les cellules adhérentes que dans les non

Chapitre II : Thérapie Génique

adhérentes [477]. Cette efficacité tient des propriétés physicochimiques de la PEI. En effet, la structure chimique du PEI incorpore une amine tous les trois atomes, ce qui lui confère une densité de charges extrêmement importante et donc une forte capacité de condensation de l'ADN. De plus, la PEI possède des amines secondaires protonables en milieu acides, qui sont capables de capter les protons dans les endosomes. Ceci induit une déstabilisation des membranes endosomales par un effet tampon appelé « éponge à proton », essentiel durant le trafic intracellulaire des polyplexes. Cet effet tampon entraîne une entrée massive des ions chlorures à l'intérieur des endosomes [479]. La forte augmentation de la concentration ionique dans les endosomes s'accompagne d'une entrée conséquente d'eau par osmose, ce qui induit une déstabilisation et une rupture membranaire suite au gonflement de l'endosome. Ceci engendre donc la libération de l'ADN dans le cytoplasme [479–482]. Il a d'ailleurs été observé que le remplacement des amines protonables par des amines quaternaires non protonables réduisait par 20 la capacité de transfection de la PEI [483]. L'excès de charges cationiques des polyplexes formés favorise les interactions non-spécifiques avec les membranes des cellules cibles, permettant leur internalisation par les cellules. Cependant, ce polymère entraîne une forte toxicité cellulaire, due à la PEI libre restant après formation des complexes, et qui représente environ 80% de la PEI totale [484]. Des effets létaux ont même été rapportés chez des souris ayant reçu des complexes à base de la PEI linéaire de 25kDa par voie systémique [485]. Cette forte toxicité a essentiellement été attribuée aux fortes quantités de charges cationiques. La purification des polyplexes formés mène à la réduction de la cytotoxicité [486], mais aussi de l'efficacité de transfection, puisque la PEI libre internalisée en même temps que les complexes participerait à l'effet tampon menant à l'échappement des polyplexes des endosomes [486].

Chapitre II : Thérapie Génique

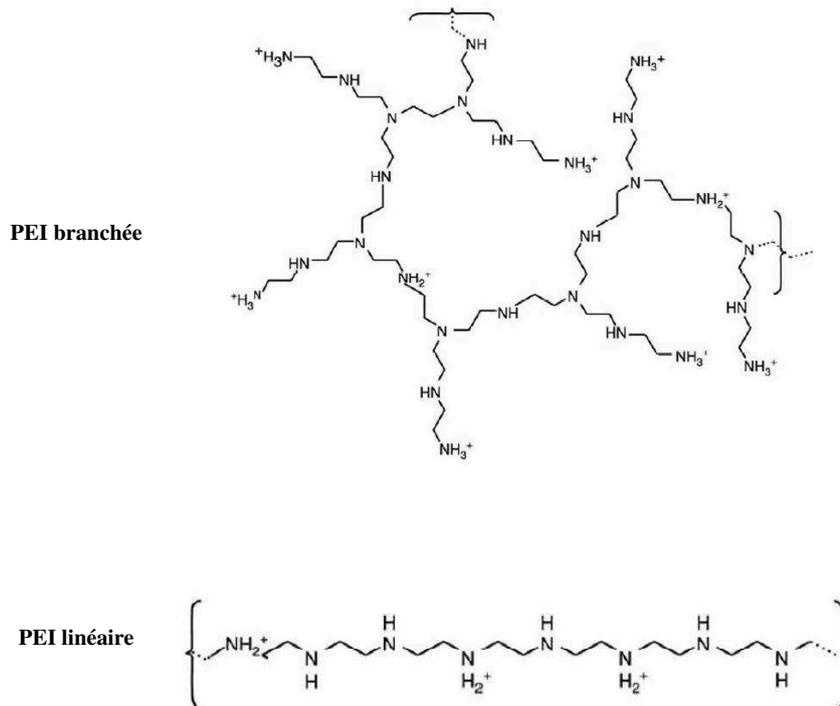


Figure 20 : Structure chimique de la PEI sous forme branchée et linéaire

Selon son degré de polymérisation, la PEI peut être sous forme linéaire ou branchée (Figure 20), avec des poids moléculaires variables (22kDa, 25kDa, ...etc.). La forme et le poids moléculaire de la PEI sont deux paramètres importants, directement en lien avec l'efficacité de transfert de gènes de ce polymère. En effet, une relation proportionnelle entre le poids moléculaire de la PEI (poids entre 600 et 70000 Da), l'efficacité de transfection et la mortalité cellulaire a été mise en évidence par Godbey et son équipe [487]. La forte toxicité engendrée par la PEI [487,488], est la conséquence de l'agrégation des polyplexes à la surface des cellules conduisant ainsi à leurs nécrose [489]. Le poids moléculaire idéal pour la formation des complexes à base de la PEI est compris entre 5 et 25 kDa [490]. Quant à la forme de la PEI, la PEI branchée (PEI25kDa) offre les meilleures efficacités de transfection, puisqu'elle permet une meilleure condensation de l'ADN [491], donnant lieu à des complexes plus stables en raison du nombre d'amines primaires disponibles [492]. Néanmoins, à poids moléculaire égale, la forme linéaire à des rapports N/P élevés (N/P : azotes portés par la PEI / phosphates portés par la construction d'acide nucléique), offre le meilleur rapport efficacité/toxicité [493].

L'aérosolisation de la PEI branchée de 25kDa a donné lieu à une expression soutenue du gène rapporteur luciférase au niveau des cellules épithéliales de l'ensemble des voies

Chapitre II : Thérapie Génique

respiratoires murines [476,494,495], et ovines [496]. Il a ainsi été démontré, que les polyplexes (PEI branchée (25kDa)/ADNp) peuvent être réadministrés à plusieurs reprises par aérosol chez la souris sans engendrer aucune cytotoxicité [476]. De plus, les complexes à base de la PEI présentent une résistance efficace vis-à-vis des forces exercées lors du processus de nébulisation [497,498]. Cependant, le pic d'expression du transgène lors des administrations répétées a significativement diminué (de 75%) par rapport à l'administration unique, bien que les dépôts pulmonaires de l'ADNp aient été similaires après chaque aérosolisation [495]. L'inhibition de l'expression de la luciférase a été corrélée au poids moléculaire de la PEI [495]. En effet, en comparaison avec les PEI de haut poids moléculaire (22 kDa, 25 kDa et 750 kDa), ceux de faible masse moléculaire (423 Da, 800 Da et 2000 Da) n'aboutissaient pas à une perte significative de l'expression de la luciférase [495]. Cependant, l'instillation des polyplexes formés à base de la PEI linéaire (22 kDa) conduit chez les rats à une expression pulmonaire, associée à une importante inflammation dès le lendemain de l'administration [499]. Par ailleurs, l'administration systémique de la PEI 22 kDa via la veine temporale supérieure des souriceaux âgés de un jour et demi, conduit à un transfert de gènes efficace dans de nombreux organes (poumons, foie, cœur, rate, cerveau et reins) [500]. Bien qu'une baisse de l'expression du transgène se produit durant la 2^{ème} semaine de vie des souriceaux, le transfert de gènes transitoire pourrait être utile dans les situations où le traitement est requis uniquement pour un temps relativement court pendant le développement (correction des anomalies de développement), comme dans le cas des déficits en protéines tensioactives B par exemple [500].

Comme pour les autres vecteurs, les différentes formes de PEI présentent des efficacités de transfection et de biodistribution différentes selon le mode d'administration [501]. En effet, après une administration intratrachéale, l'efficacité de transfection des polyplexes formés à base de la PEI linéaire (22 kDa) ou de la PEI branchée (25 kDa) était similaire, mais les complexes formés avec la PEI branchée étaient localisés dans les bronches, tandis que ceux formés avec la PEI linéaire se retrouvent plutôt dans la région alvéolaire. Ceci suggère que ces polyplexes sont capables de traverser la barrière du surfactant. Après une injection systémique, les complexes composés de la PEI linéaire de 22 kDa sont principalement localisés dans les alvéoles et notamment dans les cellules endothéliales et les pneumocytes de type I et II, tandis que ceux formés avec de la PEI branchée de 25 kDa n'ont pas été détectés dans les poumons [501]. L'ensemble de ces études démontrent que les polyplexes formés de la PEI linéaire 22 kDa sont capables de traverser la barrière endothéliale et de transférer les cellules environnantes. Quant à l'efficacité de transfection obtenues au niveau

Chapitre II : Thérapie Génique

pulmonaire, elle serait due au blocage des complexes à ce niveau-là [502], engendrant un risque d'embolie pulmonaire [503].

Afin de diminuer la toxicité de la PEI et d'accroître son efficacité ou encore favoriser un ciblage cellulaire, de nombreuses modifications chimiques ont été successivement apportées à la PEI. À titre d'exemple, l'ajout du PEG a largement été utilisé afin de limiter les interactions avec les protéines plasmatiques et les autres composants du sang. L'utilisation du PEG augmente ainsi le temps de circulation sanguine des polyplexes, réduit aussi la toxicité induite par la PEI, mais diminue aussi son efficacité de transfection. En effet, les polyplexes pégylés présentent une densité de charge réduite à leur surface, ce qui entraîne une diminution des interactions avec les membranes cellulaires, et donc une diminution de leur internalisation par les cellules [487]. Il a été démontré que les polyplexes (ADNp/PEI) qui incorporent l'acide γ polyglutamique (γ -PGA) à la surface de la PEI, donnaient lieu à une efficacité de transfection élevée et surtout une faible toxicité et sans agglutination avec les érythrocytes [504]. L'acide γ polyglutamique pourrait donc être utilisé comme alternative au PEG. Des monomères de la bétaine (N,N-diméthyl(acrylamidopropyl) ammonium propane sulfonate, DMAAPS) ont également été greffés à la PEI 25kDa, conduisant à des polyplexes à faible toxicité, une adsorption protéiques réduite, tout en maintenant leur efficacité de transfection [505]. Sur modèles cellulaires, on obtient en effet plus de 56% de cellules transfectées avec la formulation PEI-DMAAPS, contre 21% pour la PEI classique [505]. L'ajout de motifs de ciblage cellulaire a également toute son importance. En effet, des résultats intéressants *in vitro* et *in vivo* ont été rapportés, en utilisant des copolymères (PEI-PEG) fonctionnalisés avec des motifs peptidiques RGD pour cibler les récepteurs aux intégrines présents à la surface des cellules endothéliales [506], ou avec des sucres spécifiques des cellules pulmonaires [506–509], ou hépatiques [510].

L'échappement endosomal peut être induit dans les endosomes précoces (pH entre 6 et 6.5), afin d'améliorer l'efficacité de transfection. À cet effet, la PEI linéaire (l-PEI) a partiellement été greffée par des résidus histidines (His-lPEI) qui possède un noyau imidazole protonable à $\text{pH} \leq 6$ [511]. Les complexes formés présentent un meilleur profil efficacité/toxicité (jusqu'à 95% de cellules transfectées), avec remarquablement une faible toxicité si on la compare à la lPEI [511]. De plus, le remplacement d'une partie des amines de la PEI réduit les effets cytotoxiques des polyplexes correspondants tout en améliorant leur capacité de délivrance du transgène [512,513].

4.2.2.2 Les dérivés de la poly-L-lysine

La poly-L-lysine (PLL) a été le premier polymère cationique utilisé pour le transfert de gènes [514]. C'est un polymère de faible poids moléculaire (< 3 kDa), formé de plusieurs lysines. La PLL possède un pKa de 10,2 qui lui permet d'être chargée positivement au pH physiologique (7,4), et ainsi interagir avec les charges négatives portées par les acides nucléiques. La complexation de l'ADN est due aux amines primaires portées par les résidus lysines, et dépend du degré de condensation de la PLL. En effet, seules les PLL de haut poids moléculaire > 3 kDa forment des complexes stables avec l'ADN, mettant en évidence l'importance du nombre d'amines primaires sur la condensation des acides nucléiques [515].

La PLL présente une importante biocompatibilité et biodégradabilité, mais contrairement à la PEI elle ne possède pas de propriétés d'effet tampon (éponge à protons). Par conséquent elle présente une faible capacité d'échappement endosomal, ce qui diminue considérablement son efficacité de transfection. Néanmoins, il est possible de générer un effet « éponge à protons » grâce au noyau imidazole de l'histidine protonable à $\text{pH} \leq 6$. Midoux et Monsigny ont démontré pour la première fois que l'efficacité de transfection augmente significativement lorsque l'on greffe 90 résidus d'histidine sur la PLL (190 résidus lysines) en comparaison à la PLL classique [516]. En présence de bafilomycine A_1 , un inhibiteur de la pompe à protons endosomale, l'efficacité de transfection des polyplexes formés (PLL-histidylée/ADN) est fortement bloquée [516]. Ceci souligne l'importance de la protonation des noyaux imidazoles des histidines sur la libération de l'ADN dans le noyau, et par conséquent, sur l'amélioration de l'efficacité de transfection des polyplexes à base de la PLL. La diminution de l'efficacité de transfert de gènes en présence de bafilomycine A_1 , a été également décrite pour la PEI [517]. En milieu acide, la PLL-histidylée pourrait avoir un effet perméabilisant ou fusiogène en plus de l'effet éponge à protons [12].

Les PLL de hauts poids moléculaires, bien qu'elles soient plus efficaces pour condenser les acides nucléiques, leur utilisation induit de forts taux de toxicité [518]. Diverses stratégies ont été mises au point pour tenter de diminuer cette cytotoxicité, telles que l'incorporation des motifs PEG [518], des groupements imidazoles [519] dans la chaîne de la PLL, et l'utilisation des dérivés dendritiques de la PLL [520]. En présence d'acides nucléiques, les PLL de hauts poids moléculaire ont tendance à former des polyplexes qui s'agrègent et précipitent en fonction de la force ionique du milieu [521]. Des copolymères à bloc de PLL ont ainsi été formulés en présence du PEG (PEG; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$) pour éviter la formation d'agrégats insolubles [522].

Chapitre II : Thérapie Génique

De multitudes dérivés de la PLL ont été développés. La PLL branchée est un vecteur synthétique attractif pour le transfert de gènes, synthétisé et produit à grande échelle. Sa caractéristique essentielle est qu'il est totalement biodégradable, ce qui pourrait réduire la toxicité cellulaire des polyplexes à base de la PLL [523]. In vitro, la PLL branchée présente des capacités de transfection similaires à celles de la PEI [523]. Des dérivés de la PLL branchée incorporant des résidus arginine (P-lys-arg_{0.10} and P-lys-arg_{0.20}) ont été synthétisés [524]. Ces dérivés sont capables d'interagir avec l'ADN pour générer des particules de taille nanométrique. Sur modèles cellulaires, il a été démontré que la polylysine simple présentait une faible capacité de condensation d'ADN, et une faible efficacité de transfection. En revanche, les dérivés riches en arginine (P-lys-arg_{0.10} and P-lys-arg_{0.20}) entraînent une amélioration significative de l'efficacité de transfection, qui est fonction de la teneur en arginine dans les polymères et du type cellulaire utilisé [524]. Le dérivé P-lys-arg_{0.20} présentait une meilleure efficacité de transfection sur les différentes lignées cellulaires utilisées, avec une toxicité particulièrement plus faible sur les cellules COS-7 (Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40) [524]. Récemment, des nanoparticules sphériques d'insuline inhalables ont été mises au point [525]. Certaines nanosphères ont été fonctionnalisées à leur surface par de la PLL de pKa ~ 10,8 afin de faciliter leur pénétration. L'administration intratrachéale de ces nanosphères a démontré que les nanoparticules contenant la PLL peuvent augmenter l'absorption de l'insuline à travers la barrière épithéliale alvéolaire [525], ce qui fait d'eux des outils potentiels pour la délivrance pulmonaire.

4.2.2.3 Lipides cationiques du laboratoire

Depuis plusieurs années, notre équipe « Transfert de gènes et Thérapie génique » de l'unité INSERM 1078 travaille en étroite collaboration avec l'équipe « Phosphore et vectorisation » de l'UMR CNRS 6521 à Brest sur le développement et l'optimisation de vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes et de biomolécules d'intérêt thérapeutique. Les connaissances structurales et fonctionnelles des phospholipides membranaires naturels laissaient supposer que les phospholipides d'inspiration biologique pourraient être d'excellents vecteurs pour le transfert de gènes. Ainsi, au fil des ans, en s'inspirant des lipides membranaires, plusieurs générations de vecteurs ont été développées. D'importantes modifications structurales ont été successivement apportées et les efficacités de transfection des lipides synthétiques ont été évaluées aussi bien in vitro qu'in vivo [526,527].

On distingue ainsi plusieurs familles de vecteurs synthétiques développées au sein de notre laboratoire. En premier lieu, on retrouve les phosphonolipides monocationiques

Chapitre II : Thérapie Génique

caractérisés par une tête polaire ammonium reliée par un bras espaceur phosphonate à un domaine hydrophobe (oléyle ($C_{18}H_{35}$), tétradécyle ($C_{14}H_{29}$), ou stéaryle ($C_{18}H_{37}$)) [528]. Par la suite, des modulations de la tête polaire ont été réalisées, comme l'utilisation des polyamines (spermine) [529], des ammoniums quaternaires [526,530] ou encore des motifs imidazolium [531,532]. Dans cette catégorie de lipides synthétiques, on retrouve le GLB73 (Figure 21). In vitro, sur plusieurs modèles cellulaires hématopoïétiques, le GLB73 présentait des efficacités de transfection significatives [533,534], ainsi qu'in vivo après injection systémique chez la souris [535,536]. Ces résultats suggèrent que la longueur de la chaîne aliphatique joue un rôle important, car les efficacités de transfection diminuent lorsque la longueur de la chaîne aliphatique augmente (C14, C16 et C18) [533]. Ainsi, l'ordre de l'efficacité de transfection en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique est: dimyristyle (di-C14: 0), dioléyle (di-C18: 1), dipalmitoyle (di-C16: 0) et distéryle (di-C18: 0) [533]. En effet, Il est connu que l'augmentation de la longueur des chaînes aliphatiques de tels composés amphipathiques augmente en même temps la température de transition de phase et la rigidité de la bicouche des vésicules résultantes [537]. Ainsi, la rigidité de la bicouche interfère avec la fusion des membranes, qui est une étape importante pour la délivrance d'ADN [538]. La rigidité membranaire peut être réduite par introduction d'insaturations dans les chaînes grasses (ex. C18 :1 > C18 : 0) [533].



Figure 21 : Structure chimique du GLB73 ([533]).

La seconde famille de vecteurs synthétiques qui fut développée est caractérisée par des têtes polaires du type arsonium ou phosphonium, ainsi que par un bras espaceur de longueur variable [539]. En effet, des études ont montré que le remplacement du cation ammonium par des fonctions phosphonium et/ou arsonium de certains agents anti-tumoraux, induit une diminution importante de la toxicité des composés sans affecter leur efficacité thérapeutique [540]. Cette propriété fut confirmée, au travers des nouveaux lipides cationiques synthétisés [539], qui présentaient, une efficacité de transfert de gènes plus importante [530,541].

Afin de favoriser la libération de l'ADN des endosomes, des têtes cationiques hétérocycliques telles que les fonctions imidazolium, thiazolium et pyridinium ainsi que l'introduction d'un nouvel espaceur phosphorylé furent également utilisées. Ces nouveaux

Chapitre II : Thérapie Génique

composés, particulièrement le KLN5, permirent une nette amélioration de l'efficacité de transfection sur lignées cellulaires (60-65% de cellules transfectées) [542]. Il est important de noter qu'un transfert efficace du gène CFTR dans des polypes nasaux issus de patients mucoviscidosiques a été obtenu avec ces composés [543]. Cependant, des niveaux différents de toxicité ont été observés, et semblent être en lien avec la nature de la tête polaire. En effet, il s'est avéré que les lipides possédant un arsonium sont moins toxiques que ceux possédant une fonction phosphonium, eux-mêmes moins toxiques que les composés incorporant un ammonium. Dans cette nouvelle famille de composés appelés lipophosphoramidates, le KLN47 possédant deux chaînes oléiques (C18 :1) (Figure 22) montra des niveaux de transfection très significatifs avec une toxicité réduite [544]. Il constitue à ce jour le composé de référence du laboratoire.

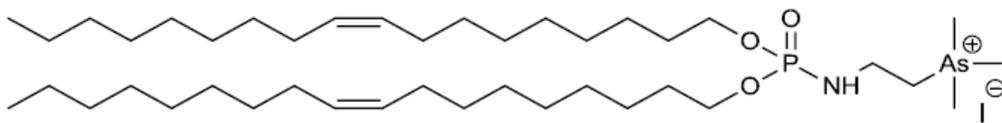


Figure 22 : Structure chimique du lipophosphoramidate KLN47 ([544]).

Depuis les travaux se sont focalisés sur la nature des chaînes grasses des lipophosphoramidates, et de nombreux analogues du KLN47 ont été synthétisés. L'objectif des variations du domaine hydrophobe, consiste à évaluer l'impact des chaînes grasses sur les propriétés physicochimiques des complexes (stabilité, fluidité, fusogénicité, toxicité,...etc.) qui peuvent être bénéfiques pour l'efficacité des lipides (échappement endosomal, trafic intracellulaire,...). Des vecteurs portant des chaînes aliphatiques essentiellement à 18 carbones, possédant de 0 à 3 insaturations ont ainsi été développés. Parmi ces nouveaux composés, le BSV4 (Brest Synthetic Vector) possédant deux chaînes linoléiques (C18 :2) (Figure 23), montra une efficacité de transfection significative au niveau du tissu pulmonaire murin après une injection systémique, par rapport au KLN47 [545]. Cependant, in vitro le BSV4 est très toxique. Bien qu'étant moins fusogène que son homologue le KLN47, le BSV4 apportait davantage de fluidité. L'administration répétée par voie systémique des lipoplexes formés à base du BSV4 complexé avec un plasmide CpG-free, conduit à une transfection pulmonaire efficace sans effets secondaires graves [546].

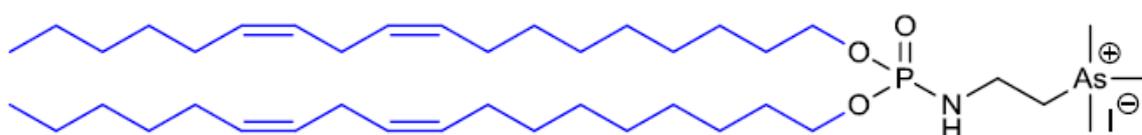


Figure 23 : Structure chimique du lipophosphoramidate BSV4 ([545])

Chapitre II : Thérapie Génique

En effet, les chaînes linoléiques apportent une certaine fluidité supplémentaire aux lipides cationiques, facilitant ainsi la transition d'une phase lamellaire (L^C_α) à une organisation supramoléculaire hexagonale, plus favorable pour la sortie des endosomes [545] (Figure 24).

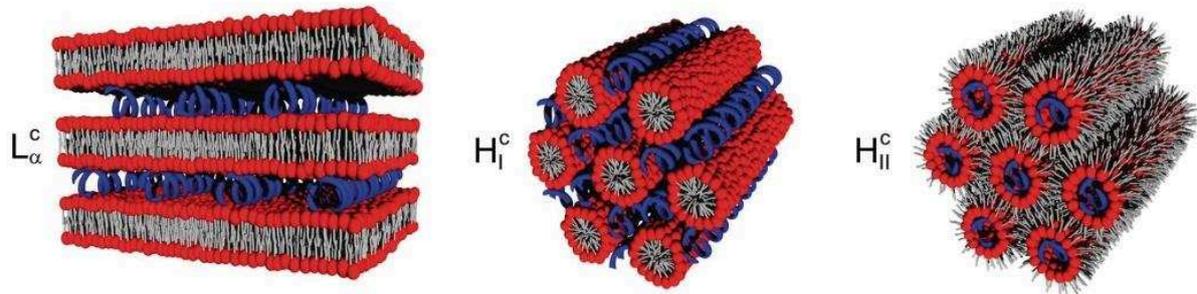


Figure 24 : Organisation supramoléculaire des lipoplexes : organisation lamellaire (L^C_α), organisation hexagonale normale (H^C_I), et hexagonale inverse (H^C_{II}). En phase lamellaire (L^C_α) l'ADN est intercalé entre les bicouches lipidiques. En phase hexagonale (H^C_I) l'ADN est localisé entre les micelles lipidiques en forme de bâtonnets disposés sur un réseau hexagonal. La phase hexagonale inverse se compose d'ADN revêtu d'une monocouche lipidique disposés sur un réseau hexagonal. Sont représentés en rouge (têtes cationiques), en gris (chaînes grasses) et en bleu (l'ADN). (D'après [547]).

Il existe plusieurs organisations structurales des lipoplexes, selon la nature des lipides utilisés, principalement l'organisation lamellaire (L^C_α), l'organisation hexagonale normale (H^C_I), et l'organisation hexagonale inverse (H^C_{II}) (Figure 24). L'organisation supramoléculaire des complexes influe fortement sur l'efficacité de transfection, notamment sur l'interaction des lipoplexes avec les membranes biologiques. Les phases hexagonales inverses sont plus fusogènes que les phases lamellaires. Une fois dans les cellules, elles semblent induire une fusion avec les membranes des endosomes, et par conséquent une meilleure libération de l'ADN à proximité du noyau [548,549].

La forme de l'amphiphile a une influence directe sur l'organisation supramoléculaire des lipoplexes. Il a d'ailleurs été démontré que les amphiphiles en forme de cône (présentant un volume plus important des chaînes hydrophobes) favorisent la formation d'une phase hexagonale inverse [550]. Ainsi, nos travaux ont été poursuivis en utilisant des chaînes lipidiques comportant des ramifications. Dans cette série de nouveaux composés, le BSV18 possédant deux chaînes phytanyles (Figure 25) s'est montré particulièrement efficace et peu

Chapitre II : Thérapie Génique

toxique *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires. De plus, *in vivo* après administration intraveineuse, le BSV18 s'est montré très efficace pour transfecter le tissu pulmonaire murin, essentiellement les pneumocytes de type I et II, en comparaison avec le KLN47 et le BSV4 [551]. Les études structurales ont montré que les chaînes phytanyles favorisent à l'inverse des chaînes oléiques (KLN47) et linoléiques (BSV4), la formation de structures de phase hexagonale inverse, une organisation supramoléculaire bénéfique pour le trafic intracellulaire (sortie des endosomes) des lipoplexes, notamment en déstabilisant la membrane des endosomes [551]. Néanmoins, la formulation du BSV18 en solution liposomale est délicate en raison de son temps d'hydratation relativement long (sept jours). En effet, les chaînes phytanyles présentent un encombrement plus important des chaînes hydrophobes ce qui par conséquent engendre une difficulté d'hydratation et nécessite donc un temps plus long pour que les lipides puissent s'auto-organiser en milieux aqueux.

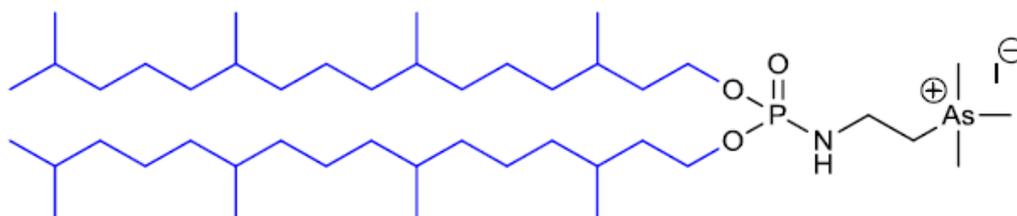


Figure 25 : Structure chimique du lipophosphoramidate BSV18 ([551])

Au cours de sa thèse, Stéphanie Le Corre de l'UMR CNRS 6521 a synthétisé de nouveaux lipophosphoramidates possédant deux chaînes lipidiques différentes, appelés lipophosphoramidates asymétriques [17], dans le but d'évaluer l'impact de la présence de deux chaînes lipidiques différentes sur les propriétés physicochimiques et transfectantes des vecteurs. Il s'agissait également d'optimiser les procédés de formulations, en comparaison avec les lipides symétriques. Comme évoqué précédemment, l'organisation supramoléculaire des structures formées dépend de la nature du vecteur (domaine hydrophobe, tête polaire,...). Par conséquent, l'incorporation de deux chaînes grasses différentes, l'une facilitant la formulation des composés (ex. chaîne oléyle), et l'autre favorisant l'organisation supramoléculaire non lamellaire (ex. chaîne phytanyle) serait très bénéfique. Dans cette optique, une série de composés asymétriques et symétriques ont ainsi été synthétisés, en utilisant des chaînes grasses saturées (C12 :0, C14 :0, C18 :0), des chaînes lipidiques avec insaturations (ex. chaînes oléyles), des chaînes ramifiées (chaînes phytanyles), et/ou un motif cholestérol (Figure 26). L'évaluation *in vitro* de ces nouveaux composés à la quelle j'ai participé, a montré que lipophosphoramides symétriques et asymétriques étaient efficaces sur les quatre lignées testées, particulièrement sur les cellules de l'épithélium bronchique [17].

Chapitre II : Thérapie Génique

Cependant, les résultats obtenus ne nous permettaient pas de conclure de façon générale quant à l'efficacité de transfection des lipides asymétriques par rapport aux symétriques [17]. En revanche, ces résultats nous ont permis de sélectionner deux lipophosphoramidates asymétriques prometteurs qui sont le BSV110 possédant une chaîne oléyle et une chaîne phytanyle, et le composé BSV111 formé d'une chaîne lauryle et d'une chaîne phytanyle (Figure 26) [17]. En effet, ces deux lipides cationiques asymétriques en plus d'être efficaces sur plusieurs types cellulaires et peu ou pas toxiques, leur formulation en solutions liposomales est plus simple (temps d'hydratation = 1 nuit) par rapport au composé BSV35 possédant deux chaînes phytanyles (temps d'hydratation = sept jours) [17]. L'incorporation des chaînes phytanyles semble être une stratégie intéressante pour améliorer la formulation et l'efficacité de transfection des nouveaux vecteurs synthétiques.

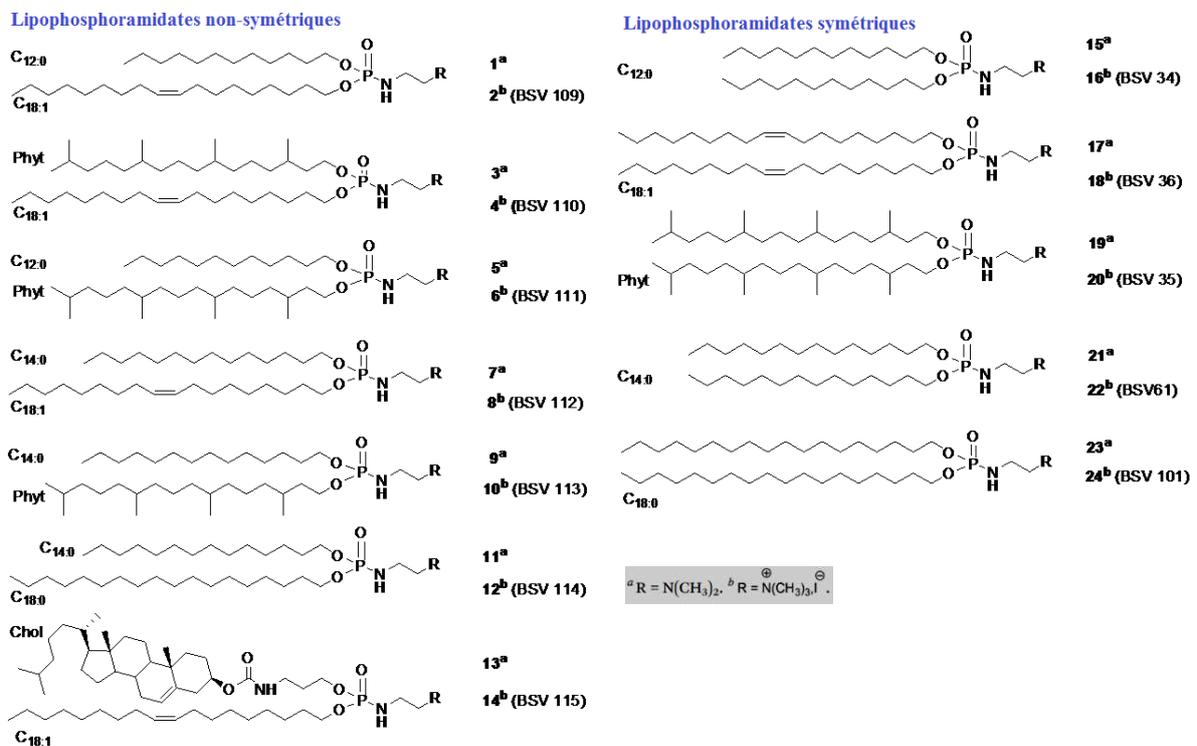


Figure 26 : Structure chimique des lipophosphoramidates symétriques et non-symétriques ([17]).

L'augmentation du nombre de charges positives permanentes par lipide est une approche permettant de réduire la quantité de vecteur nécessaire pour la condensation et la délivrance des acides nucléiques d'intérêt. C'est une approche intéressante lors des administrations par voies aériennes (aérosol, instillation,...), qui nécessitent des solutions lipidiques très concentrées. Pour cela, divers lipophosphoramidates portant des têtes dicationiques associant

Chapitre II : Thérapie Génique

un ammonium ou un imidazolium avec un ammonium, un phosphonium ou un arsonium ont été synthétisés puis évalués [18,531]. Ces composés dicationiques présentaient des efficacités de transfection significatives *in vitro*, particulièrement le composé possédant un ammonium central et un phosphonium terminal qui s'est avéré plus efficace et moins toxique en comparaison avec les autres composés dicationiques et monocationiques [552]. Récemment, au cours de sa thèse Stéphanie Le Corre de l'UMR CNRS 6521 a synthétisé des phosphates d'aryle dicationiques (Figure 27) [18]. Les résultats d'évaluation *in vitro* donnèrent des efficacités de transfection relativement faibles [18]. En effet, en comparaison avec les composés monocationiques, les lipophosphates dicationiques développés condensaient davantage les acides nucléiques conduisant à la formation de structures supramoléculaires très stables (CR 2 à 4), ce qui limite par la suite la libération des plasmides par les complexes après internalisation cellulaire.

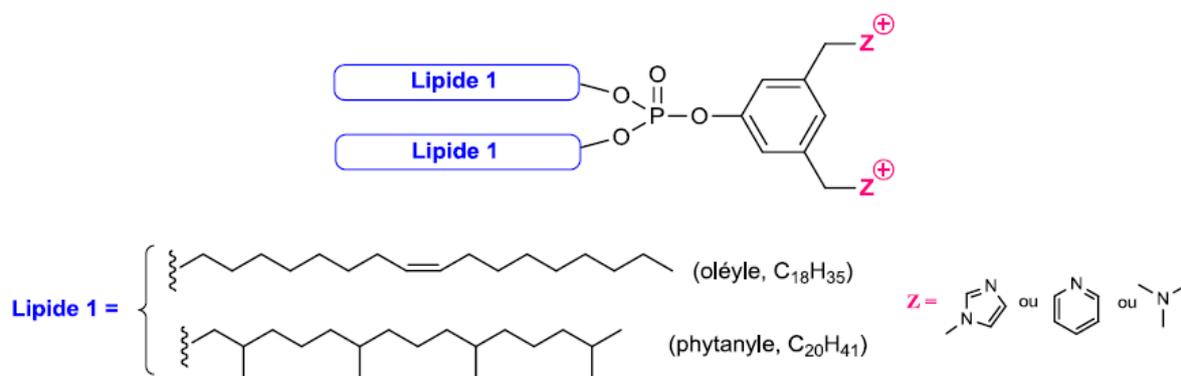


Figure 27 : Structure chimique des lipophosphates dicationiques ([18]).

Durant ma thèse nous nous sommes intéressés à la biodistribution des lipoplexes en fonction de la voie d'administration. En effet, les vecteurs synthétiques peuvent avoir des profils de distribution tissulaire différents, et une clairance plus ou moins rapide en fonction des caractéristiques physicochimiques et du mode d'administration. Il est donc important d'étudier la biodistribution, l'élimination des complexes, et les barrières biologiques qu'ils doivent surmonter pour atteindre leur cible, afin d'adapter les structures chimiques aux voies d'administrations, pour en accroître l'efficacité de transfection. Pour cela, l'étiquetage des lipoplexes, par une sonde fluorescente nous est apparue comme une approche intéressante et bien établie [553–555]. Des lipophosphoramidates neutres possédant un fluorophore localisé au niveau de la tête polaire [554], ou contenant des sondes fluorescentes localisées au niveau du domaine hydrophobe [555], ont ainsi été synthétisés. Les tests *in vitro* sur différentes lignées cellulaires montrèrent que les lipophosphoramidates neutres fluorescents étaient aussi efficaces et peu toxiques que les lipophosphoramidates non fluorescents. Les

Chapitre II : Thérapie Génique

lipophosphoramidates neutres fluorescents transfectaient efficacement le tissu pulmonaire murin après administration intraveineuse sur souris saines, et étaient bien tolérés. Ces résultats montrent que l'addition de sondes lipidiques fluorescentes aux solutions liposomales des lipophosphoramidates ne modifie vraisemblablement pas les propriétés physicochimiques (stabilité, efficacité de transfection, toxicité,...etc.) de ces derniers. Ces nouveaux systèmes constituent donc des outils intéressants pour l'étude de la biodistribution des lipoplexes via différentes techniques. (Voir chapitre V : Résultats : point 1)

5 Importance de la séquence d'acide nucléique

La nature et la structure de la séquence d'acide nucléique a autant d'importance que la structure du vecteur utilisé [447,556]. La plupart des essais précliniques et cliniques ont été menés avec des plasmides où l'expression du transgène est sous le contrôle d'un promoteur viral, tel que le promoteur du CMV. Les promoteurs viraux permettent généralement une expression élevée du transgène mais très transitoire. La recherche de l'optimisation du design des plasmides a amené à l'utilisation d'autres promoteurs cellulaires et éléments régulateurs. Une approche a permis en particulier d'identifier un promoteur hybride qui associe des éléments régulateurs du virus CMV et du promoteur cellulaire hCEFI (human cellular elongation factor I) [556]. Par ailleurs, il est admis que la présence des motifs CpG non méthylés dans le plasmide peut induire l'activation du système immunitaire inné et conduire ainsi au développement d'une réaction inflammatoire qui limite l'expression du transgène [396]. Ainsi, les recherches se sont concentrées à essayer d'éviter l'effet négatif de la présence des motifs CpG non-méthylés sur la transfection. Hyde et son équipe ont montré qu'un plasmide dépourvu des motifs CpG permettait non seulement de réduire l'inflammation mais conduisait également à une expression soutenue du transgène au niveau des poumons de souris [557]. D'autres stratégies visent à améliorer l'import nucléaire des plasmides par incorporation de séquences nucléotidiques capables de favoriser leur trafic nucléaire [15]. Enfin, tout comme pour les vecteurs synthétiques, les procédés de production de l'ADN plasmidique à grande échelle, sont un point important qu'il convient mieux de maîtriser.

Chapitre III : Biodistribution

1 Généralités

Lors d'une administration systémique et/ou locale, les complexes doivent circuler plus ou moins longtemps (en fonction de la voie d'administration) avant d'atteindre les cellules cibles. Cependant, de nombreuses barrières s'opposent à la délivrance de transgènes tout au long de ce trajet, accélérant ainsi l'élimination des complexes [6,9]. Les propriétés structurales et physicochimiques des vecteurs influent largement sur l'efficacité, la biodistribution et l'élimination des complexes. En effet, les principales barrières sont liées à leur instabilité, leur agrégation et leur capture par le MPS [9]. Ainsi, dans le but d'affiner la conception et la formulation des nanoparticules, leurs profils en termes de biodistribution et d'élimination ainsi que les barrières cellulaires auxquelles ils doivent faire face, doivent être explorés. Selon le mode d'administration, des modifications structurales doivent donc être apportées aux vecteurs ainsi qu'aux procédés de formulation pour surmonter les obstacles cellulaires majeurs qui limitent leur efficacité.

Il existe différents modes d'administration (voie intraveineuse, inhalation, la voie per os, ...), qui permettent une diffusion plus ou moins rapide dans la circulation sanguine. Ainsi, il est important de décrire brièvement le système circulatoire et ses composants pour mieux comprendre les barrières cellulaires s'opposant au transfert de gènes et de molécules thérapeutiques en règle générale.

2 Système circulatoire

Le système circulatoire (circulation sanguine), a pour rôle d'assurer le transport de diverses molécules (nutriments, O₂, hormones,...etc) vers les cellules, et également de débarrasser l'organisme de ces déchets (ex. CO₂). Ce dernier emprunte deux circulations distinctes (Figure 28) :

- **La grande circulation** appelée également circulation générale ou systémique, qui irrigue l'ensemble de l'organisme. Elle part du cœur vers le reste des organes pour revenir ensuite vers le cœur. Elle apporte à tous les tissus de l'organisme de l'oxygène, les nutriments et les autres substances essentielles, et elle les débarrasse du gaz carbonique et des autres déchets métaboliques.
- **La petite circulation** dite pulmonaire, a pour rôle de faire entrer le sang en contact étroit avec les alvéoles, lieu où s'effectuent les échanges gazeux. Elle part du cœur vers les poumons puis revient au cœur.

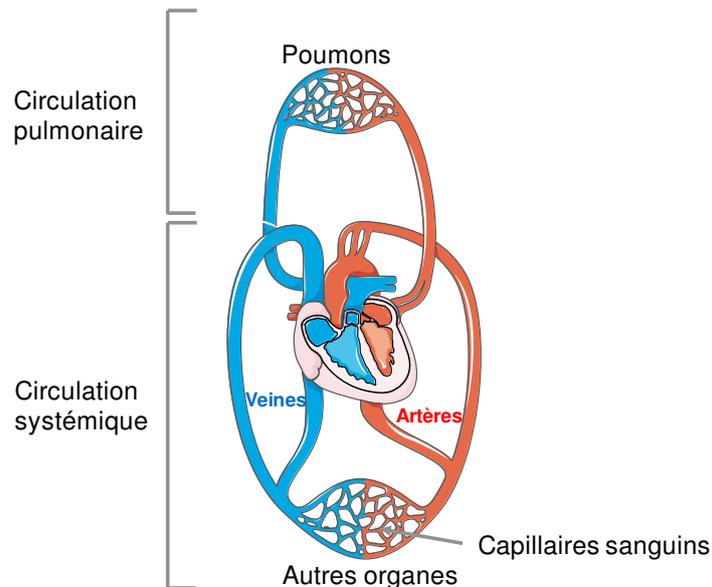


Figure 28 : *Circulation sanguine pulmonaire et systémique (modifiée d'après Servier Medical Art).*

La circulation permanente du sang dans l'organisme s'effectue dans un réseau vasculaire composé d'artères, de veines et de capillaires (Figure 28). Les artères (véhiculent le sang oxygéné du cœur vers les organes) et les veines (ramènent le sang chargé du CO₂ vers le cœur) servent simplement de conduits pour le sang. Seuls les capillaires sont en contact étroit avec les cellules. Leurs parois extrêmement fines permettent les échanges entre le sang et le liquide interstitiel dans lequel baignent les cellules. Ces échanges fournissent aux cellules les nutriments et l'oxygène nécessaires à leur physiologie normale. La longueur totale des vaisseaux sanguins d'un humain adulte est estimée à environ 100.000 Km.

2.1 Structure des parois vasculaires

Comme l'illustre la Figure 29, les parois des artères et des veines sont composées de trois couches concentriques, entourant un espace central où circule le sang, et que l'on appelle lumière.

La tunique interne (intima) formée par l'endothélium, un épithélium pavimenteux simple qui tapisse la lumière de tous les vaisseaux.

La tunique moyenne (media), composée de cellules musculaires lisses, de fibres élastiques disséminées et des feuillettes continus d'élastine. Elle est dotée d'une élasticité naturelle grâce à ses cellules musculaires lisses, permettant à l'artère de modifier son calibre en se contractant ou en se dilatant. Ses variations de diamètre ont des effets marqués sur le débit et la pression sanguine. La tunique moyenne est donc la partie vivante de l'artère, elle joue un rôle prépondérant dans la régulation de la circulation sanguine.

Chapitre III : Biodistribution

La **tunique externe** (externa ou adventice) est composée essentiellement de fibres collagènes entrelacées, qui protègent les vaisseaux et les ancrent aux structures environnantes. Elle contient également quelques cellules de soutien.

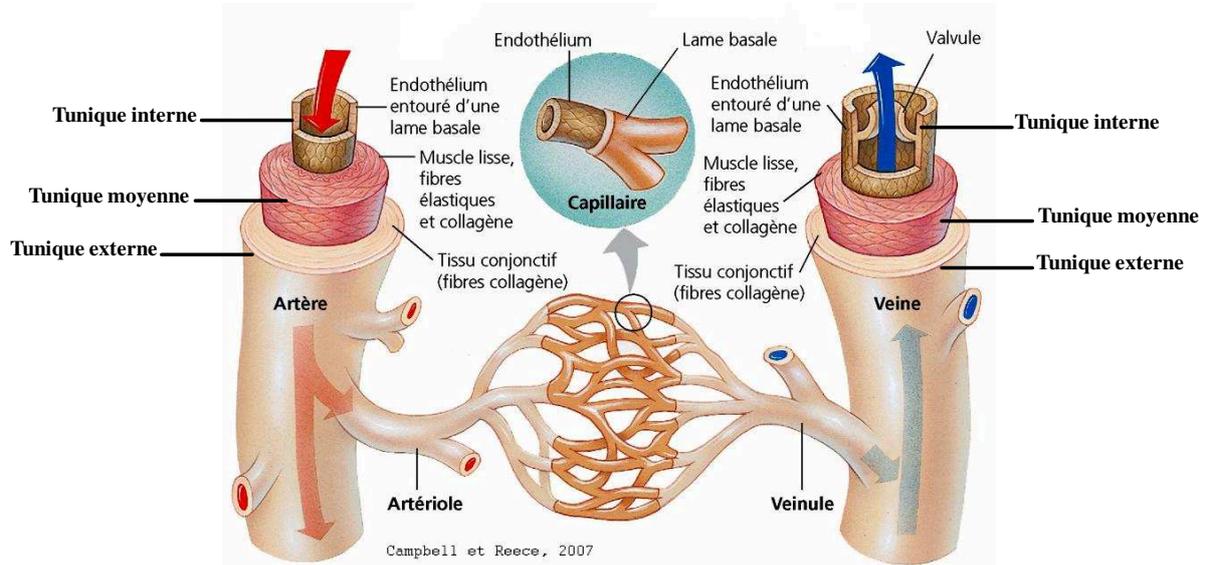


Figure 29 : Structure et composition des parois des artères, des veines et des capillaires [558].

Ces trois types de vaisseaux diffèrent par leur longueur, par leur diamètre ainsi que par l'épaisseur et la composition de leurs parois. En effet, les capillaires impliqués dans les échanges entre le sang et le liquide interstitiel, sont les plus petits vaisseaux sanguins. Leurs parois extrêmement minces sont formées d'un endothélium continu mince reposant sur une lame basale (Figure 29). Leurs cellules sont séparées par des fentes qui facilitent les échanges entre le sang et le liquide interstitiel. Les capillaires mesurent en moyenne 1 mm de long, et leur diamètre moyen n'est que de 8 à 10 μm , soit juste la taille nécessaire pour laisser passer les globules rouges en file indienne. La plupart des tissus sont riches en capillaires. Cependant, des exceptions existent, comme par exemple les tendons et les ligaments qui sont peu vascularisés. C'est aussi le cas du cartilage et des épithéliums qui sont dépourvus de capillaires, mais irrigués par les vaisseaux des tissus conjonctifs environnants.

2.2 Le sang

Le sang est un liquide visqueux et légèrement alcalin (pH entre 7,34 et 7,45) représentant environ 8% du poids corporel. Le volume sanguin d'un adulte sain est de 5 à 6 L chez l'homme et de 4 à 5 L chez la femme, contre 1.5 mL chez la souris (de 20 g environ) [559]. Le sang est un tissu conjonctif complexe composé **d'éléments figurés** en suspension dans une matrice extracellulaire liquide appelée **plasma** (Figure 30).

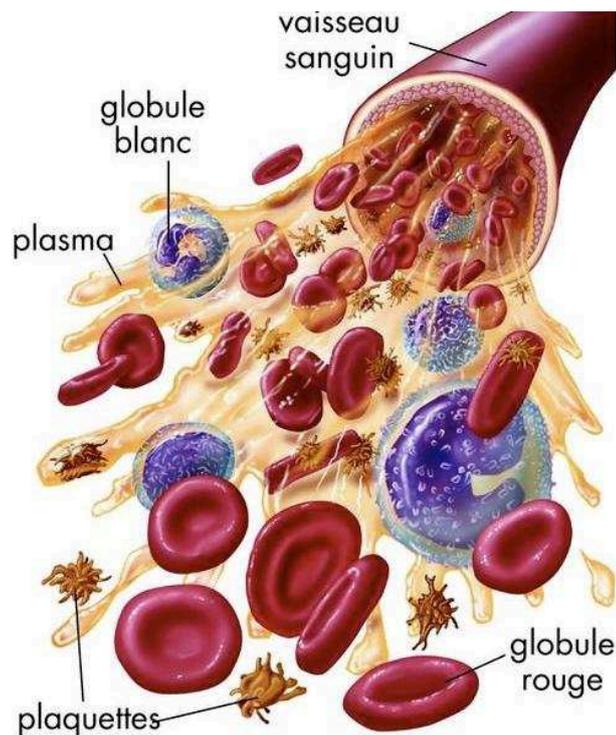


Figure 30 : Composition du sang [560]. Les éléments figurés (globules rouges, leucocytes et plaquettes) baignent dans un liquide jaunâtre visqueux appelé plasma.

Les éléments figurés sont les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes (Figure 30). Ils représentent 45% du sang total. Les érythrocytes assurent le transport de l'oxygène et du gaz carbonique. Quant aux leucocytes, ils jouent un rôle capital dans la protection de l'organisme et dans la lutte contre les maladies (particulièrement infectieuses).

Le plasma est un liquide visqueux de couleur jaunâtre (Figure 30) composé à 90% d'eau et à 10% de solutés tels que des nutriments, des gaz respiratoires, des ions, des hormones et des protéines. Le plasma représente 55% du sang total. Les protéines plasmatiques, pour la plupart produites par le foie, comprennent l'albumine, les globulines et les facteurs de coagulation. L'albumine qui constitue environ 60% des protéines plasmatiques, est un important tampon du sang (c'est-à-dire qu'elle participe au maintien du pH sanguin). Elle exerce une pression osmotique qui préserve l'équilibre hydrique entre le plasma et le liquide interstitiel. À la différence, le sérum est un liquide sanguin débarrassé de ses cellules et des protéines de la coagulation.

Le sang assure de nombreuses fonctions. En effet, d'un point de vue du transport des gaz et l'élimination des déchets métaboliques ainsi que la distribution des hormones le sang est impliqué. Le sang est également impliqué dans la régulation et le maintien de la température

corporelle, du pH normal dans les tissus et également le maintien d'un volume adéquat de liquide dans la circulation sanguine. En effet, le chlorure de sodium et d'autres sels, en combinaison avec des protéines sanguines (ex. albumine), empêchent le transfert du plasma dans le liquide interstitiel. D'un point de vue de la protection de l'organisme, les fonctions du sang sont l'hémostase et la prévention des infections.

3 Voies d'administration

3.1 Voie systémique

Lorsque l'on cherche un effet général et rapide, le médicament doit être administré par voie parentérale. Le choix de la voie d'administration dépend du médicament d'une part (existence de formulations compatibles avec ces modes d'administration), mais également de l'état de l'individu d'autre part (de l'animal pour l'in vivo). La voie intraveineuse est le mode d'administration le plus simple et le plus utilisé aussi bien en clinique qu'en préclinique. Elle offre une biodisponibilité rapide et élevée du principe actif, c'est-à-dire qu'elle permet la diffusion dans l'ensemble de l'organisme, y compris les tumeurs primaires et leurs métastases lorsqu'elles existent. En préclinique, elle est utilisée comme voie d'évaluation de nouvelles formulations. Cependant, bien qu'elle soit relativement simple d'utilisation, la voie intraveineuse n'est pas la plus adaptée lorsque l'objectif est d'assurer une délivrance de gènes à destination de l'épithélium pulmonaire, en raison de l'endothélium vasculaire difficilement franchissable. De plus, la voie intraveineuse est un mode d'administration invasive. En plus du métabolisme lié au premier passage hépatique, l'injection intraveineuse (IV) présente de nombreuses barrières limitantes pour le transfert de gènes. En effet, le devenir des complexes administrés dépend en grande partie de leurs interactions avec les éléments du sang (Figure 30). Une fois dans la circulation sanguine, les risques d'élimination des particules injectées sont multiples, limitant par conséquent leur efficacité. L'administration systémique de lipoplexes et/ou polyplexes provoque des effets secondaires transitoires. De nombreuses études ont décrit une toxicité-dose dépendante après injection systémique de différents complexes (tels que le GL67, GL62 (N1-spermine cholesterylcarbamate), DMRIE, ou le mélange DOTMA/DOPE) cationiques chez la souris. Cette toxicité a été mise en évidence par des analyses sanguines qui ont révélé des changements hématologiques et sérologiques caractéristiques de leucopénie et thrombocytopénie profondes, accompagnés d'une cytolysse hépatique [546,551,561,562]. Les différentes barrières cellulaires liées à la délivrance par la voie systémique seront développées un peu plus loin dans le manuscrit (page 86).

3.2 Voie locale pulmonaire

Pour les approches thérapeutiques visant les maladies génétiques et acquises affectant les poumons, le poumon est une cible idéale pour la délivrance de gènes, en raison de sa grande surface [563]. De plus, le tissu pulmonaire est accessible par une administration locale intratrachéale et/ou par aérosol [564]. L'administration locale par les voies aériennes est une voie non-invasive. La délivrance de gènes par voie pulmonaire présente plusieurs avantages, telles que la diminution des effets secondaires systémiques, l'absence de séquestration des complexes par les protéines du sérum et le foie, l'utilisation de plus faibles quantités de vecteurs, en comparaison avec la voie systémique.

Il a été rapporté que 24 heures après instillation intratrachéale des complexes PEI25kDa/ADNp, l'expression du gène rapporteur était environ 12 fois plus élevée chez les animaux ayant reçu les polyplexes (PEI25kDa/ADNp) par rapport aux souris traitées avec l'ADN nu [565]. Toutefois, l'administration intratrachéale induit une expression inégale et hétérogène du transgène, en raison de la faible diffusion des polyplexes par rapport à la voie systémique [566,567]. Par rapport à l'administration intratrachéale, la délivrance des polyplexes par aérosol est non seulement la technique la plus adaptée mais également la plus efficace. En effet, l'aérosolisation conduit à une distribution plus homogène de l'expression du transgène [565,568,569]. L'importance et l'efficacité de l'aérosolisation a également été démontrée récemment dans un essai clinique mené par le consortium britannique de thérapie génique de la mucoviscidose [321]. En effet, la délivrance par aérosol des complexes GL67A/pGM169 (plasmide codant pour le CFTR humain) entraîne une stabilisation des fonctions respiratoires des patients mucoviscidosiques [321]. Par ailleurs, la délivrance par voie d'aérosolisation des complexes PEI/plasmide p53 induit chez les souris une réduction significative du nombre et de la taille des tumeurs pulmonaires, et prolongent le temps de survie des animaux [570]. Cependant, plusieurs barrières physiologiques telles que le système immunitaire inné du poumon, le mucus des voies respiratoires, les protéines tensioactives du surfactant et les macrophages alvéolaires s'opposent à la délivrance de gènes dans les poumons. En outre, la barrière épithéliale entrave l'adsorption et/ou le passage des transporteurs de gènes, via les jonctions serrées intercellulaires, ainsi que le dépôt d'actine sur la surface, la structure du glycocalyx limitent l'endocytose des complexes [571].

4 Barrières intra et extracellulaires

L'efficacité de transfection relativement faible des vecteurs synthétiques s'explique par la combinaison de barrières extracellulaires et intracellulaires. Ainsi, améliorer notre

Chapitre III : Biodistribution

compréhension de l'impact de ces obstacles sur l'efficacité de transfert de gènes et le développement de stratégies pour les surmonter avec succès, ne peut être que bénéfique pour la conception de systèmes efficaces. Les barrières s'opposant au transfert de gènes sont nombreuses. Elles incluent les interactions avec les membranes cellulaires et l'internalisation des complexes, le trafic intracellulaire, l'échappement des endosomes et la translocation à travers la membrane nucléaire. De nombreux systèmes de transfert de gènes présentent une efficacité significative *in vitro*. Cependant, certains des résultats des essais *in vitro* ne sont pas transposables directement à l'*in vivo*. En effet, l'utilisation avec succès des vecteurs non-viraux *in vivo* est beaucoup plus compliquée et dépend de nombreux facteurs qui régissent leur efficacité de transfection, tels que le mode d'administration, la dose du vecteur, les interactions avec les constituants du sang (si IV), l'élimination par le système immunitaire, ...etc. ainsi il est important d'identifier les barrières cellulaires auxquelles doivent faire face les vecteurs de transfert de gènes pour mieux améliorer leur design.

4.1 Barrières extracellulaires selon le mode d'administration

4.1.1 Voie systémique

4.1.1.1 Interactions avec les éléments sanguins

Lors d'une administration systémique, la première barrière rencontrée par les systèmes de transfert de gènes est les constituants du sang. En effet, les interactions entre les complexes injectés et les constituants sanguins (ex. protéines sériques,...) sont déterminantes pour le devenir des systèmes de délivrance de gènes et leur efficacité. La charge positive des complexes peut représenter un inconvénient pour leur application *in vivo*. En effet, une particule chargée positivement est plus facilement reconnue par les cellules du système immunitaire car les protéines sériques fixées à sa surface, conduisent à la déstabilisation et à l'élimination des complexes [572–574]. Une fois dans la circulation sanguine, les particules chargées positivement sont opsonisées par les protéines plasmatiques telles que les immunoglobulines de type IgG et IgM, les protéines de la cascade de la coagulation... [572], conduisant à leur élimination rapide par les macrophages au niveau du foie (cellules kupffer), de la rate et des poumons [575]. Ainsi, la dissimulation de la charge de surface semble essentielle pour une administration systémique. De plus, cette opsonisation peut également activer le système du complément, l'un des mécanismes de l'immunité innée [576], qui à son tour active les processus de phagocytose et déclenche une réponse inflammatoire contre les complexes cationiques [577]. Les complexes de délivrance de gènes peuvent également interagir avec d'autres protéines sériques (ex. l'albumine, les lipoprotéines et

Chapitre III : Biodistribution

macroglobulines) entraînant une modification des caractéristiques physicochimiques des complexes essentiellement, la taille et la charge de surface qui devient négative [578]. Ces interactions peuvent induire une déstabilisation des complexes et une libération des acides nucléiques, qui peuvent ensuite être reconnus par les récepteurs Toll-like (ex. TLR9 qui reconnaît les ADN bactériens [579]), exprimés par les cellules B et les cellules dendritiques, entraînant la production de cytokines à l'origine de la toxicité des complexes [580]. Les acides nucléiques libérés dans la circulation sanguine peuvent également être dégradés par les nucléases. En résumé, Le niveau de clairance des systèmes de transfert de gènes du système circulatoire, dépend de leurs caractéristiques physicochimiques de surface. Pour être indétectables et furtifs vis-à-vis des macrophages, les complexes doivent être aussi petits et neutres que possible [581,582]. La mise au point de formulations furtives repose sur la modification de la surface des vecteurs, afin de réduire le processus d'opsonisation et de reconnaissance par les phagocytes du MPS et des composants sanguins [582]. Dans ce sens, la pégylation est le moyen le plus communément utilisé pour l'élaboration de formulations furtives. En effet, les chaînes de PEG forment un réseau hydrophile dense autour des complexes augmentant ainsi leur stabilité et leur biodisponibilité et forment une barrière stérique entre les particules et les composants du milieu qui les entoure [582–584]. L'efficacité de la pégylation dépend largement de nombreux paramètres tels que le PM du PEG, la densité, la conformation et la longueur des chaînes PEG [582]. La plupart des auteurs préconisent un PM efficace dans la gamme de 1500 à 3500 Da pour réduire l'adsorption des protéines *in vitro*, mais pour éviter l'internalisation par les macrophages, les chaînes PEG doivent être très longues (20000 Da) pour être efficaces [585,586]. Cependant, la pégylation n'est pas sans inconvénients. En effet, le PEG interfère dans les interactions électrostatiques entre les complexes cationiques et les cellules cibles conduisant à une diminution significative de l'internalisation des complexes, aboutissant à des niveaux de transfection significativement faibles *in vitro* et *in vivo* [587–592]. Le PEG peut également diminuer le taux d'échappement endosomal des complexes [593,594]. De plus, les études récentes ont montré que le PEG est immunogène [595], son utilisation entraîne la production d'anticorps anti-PEG conduisant à une clairance sanguine accélérée des complexes pégylés et par conséquent une diminution de l'efficacité de transfection [596], ce qui constitue un obstacle pour les administrations répétées. Pour surmonter ces inconvénients, l'utilisation de ligands de ciblage ou de motifs PEG clivables peut être envisagée [588,592]. Une étude récente indique que le polyglycérol (PG) qui est non immunogène, peut représenter une alternative prometteuse au PEG en empêchant le phénomène de clairance sanguine accélérée lors d'administrations répétées de

particules, permettant ainsi l'amélioration de l'efficacité des lipopexes et polyplexes in vivo [597].

4.1.1.2 Biodistribution et Expression du transgène

Une fois dans la circulation sanguine, les complexes sont transportés vers le cœur par un ensemble de vaisseaux sanguins, en passant d'abord par la microcirculation pulmonaire avant d'être distribués dans les autres organes. De nombreuses études de biodistribution montrent une accumulation des complexes cationiques principalement dans les poumons, le foie et la rate [598]. Cette accumulation peut être expliquée par le fait que les systèmes synthétiques requièrent des concentrations élevées de lipopexes ou polyplexes pour une efficacité optimale. Ces particules de charge positive agrègent facilement lorsque leur concentration augmente, notamment par interactions avec les protéines sériques. Ces agrégats, qui sont généralement inefficaces pour le transfert de gènes peuvent être toxiques, particulièrement en raison de la séquestration des particules dans des différents organes (poumons, foie,...) [503]. En effet, comme décrit précédemment, le réseau pulmonaire, chez l'homme comme chez l'animal est composé de capillaires très fins d'un diamètre allant de 2 à 13 μm . L'épaisseur de la barrière air-sang diminue progressivement lors du passage de la région trachéobronchique (où la paroi est d'au moins de 10 μm), vers la région alvéolaire (< 0,3 à 1 μm d'épaisseur) [599]. Ainsi, seules les particules ayant un diamètre inférieur à 3 μm traversent la microcirculation pulmonaire pour être ensuite distribuées vers d'autres tissus [503]. Celles présentant un diamètre supérieur quant à elles restent définitivement bloquées au niveau pulmonaire [503], engendrant par conséquent un risque d'embolie pulmonaire [572]. Cependant, alors qu'un fort pourcentage (50-60 %) de complexes injectés est piégé dans le foie, les niveaux d'expression du transgène les plus élevés dans les différents tissus sont généralement mesurés dans les poumons et la rate [600–602]. Les cellules épithéliales pulmonaires sont très riches en protéines anioniques telles que les protéoglycanes à leur surface externe [603,604], ce qui permet aux complexes cationiques d'adhérer et de délivrer le transgène, d'où la forte expression de ce dernier au niveau des poumons [604–606]. En outre, une accumulation de vecteurs de transfert de gènes dans les poumons peut être expliquée par l'interaction électrostatique des systèmes cationiques avec les membranes érythrocytaires chargées négativement [607]. Cependant, de nombreux facteurs tels que le type de plasmide [495,546,557], le vecteur [527,545,551], et les techniques de marquages appliquées aux acides nucléiques et/ou au système de transfert de gène [6,608,609], ont un impact important sur la biodistribution des complexes et sur l'expression du transgène. De plus, les

Chapitre III : Biodistribution

modifications des propriétés de surface des complexes cationiques (ex. PEG...) limitent l'accumulation des particules dans les organes filtres (foie, poumons et rate). En effet, il a été constaté que les lipoplexes contenant 10% de PEG dans leur composition, entraîne une rétention réduite des lipoplexes dans les tissus pulmonaires et cardiaques des souris nues en comparaison avec les non-pégylés [610]. Cependant, aucune différence significative en terme de délivrance de gènes dans les tumeurs xéno greffées n'a été observée [610].

4.1.1.3 *L'inflammation*

L'activation du système immunitaire inné suite à l'injection intraveineuse des complexes a été rapportée dans de nombreuses études [551,611,612]. En effet, les acides nucléiques libérés dans la circulation sanguine peuvent être reconnus par les récepteurs Toll-like ; TLR3 qui reconnaît l'ARN double brin [613], TLR 7 et TLR 8 qui reconnaissent les ARN simple brin [614], et le TLR9 qui reconnaît les motifs CpG portés par les plasmides [579]. Ceci conduit à la production de cytokines proinflammatoires (IFN γ , IL6, TNF α , ...) [579,615], accompagnée souvent de toxicités hépatiques et pulmonaires transitoires [562,616,617]. De plus, dans les voies respiratoires des patients mucoviscidosiques la situation est aggravée par l'inflammation chronique installée suite aux infections bactériennes [618,619]. Plusieurs stratégies ont été développées pour éliminer ou réduire la réponse inflammatoire liée à l'administration systémique des lipoplexes, telles que l'administration séquentielle des liposomes cationiques puis d'ADN qui réduit considérablement la production de cytokines proinflammatoires chez la souris [620], et la mise au point de plasmides entièrement CpG free [495,557].

4.1.2 Voie pulmonaire

Comme mode d'administration locale, la voie pulmonaire (ex. aérosolisation) constitue un moyen de délivrance de gènes idéal pour le traitement de diverses pathologies, comme la mucoviscidose, l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Elle est également idéale pour le traitement des infections bactériennes, de l'inflammation excessive et d'autres manifestations respiratoires. Cependant, le succès de la délivrance de gènes par voies aériennes dépend fortement : (i) du dépôt des complexes dans les voies respiratoires, (ii) de la perméation à travers le mucus, (iii) de l'interaction des complexes avec les cellules cibles, (iv) de l'inflammation et de la clairance des particules par les macrophages alvéolaires (Figure 31). La capacité des complexes à traverser le biofilm bactérien est également d'une grande importance par rapport à l'efficacité de transfection. Ainsi, la compréhension du comportement des complexes aérosolisés et de leurs interactions avec l'environnement

Chapitre III : Biodistribution

pulmonaire est cruciale pour le développement de formulations aérosolisables efficaces pour la thérapie génique, notamment de la mucoviscidose. En ce sens, la mucoviscidose constitue un modèle intéressant qui permet la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques.

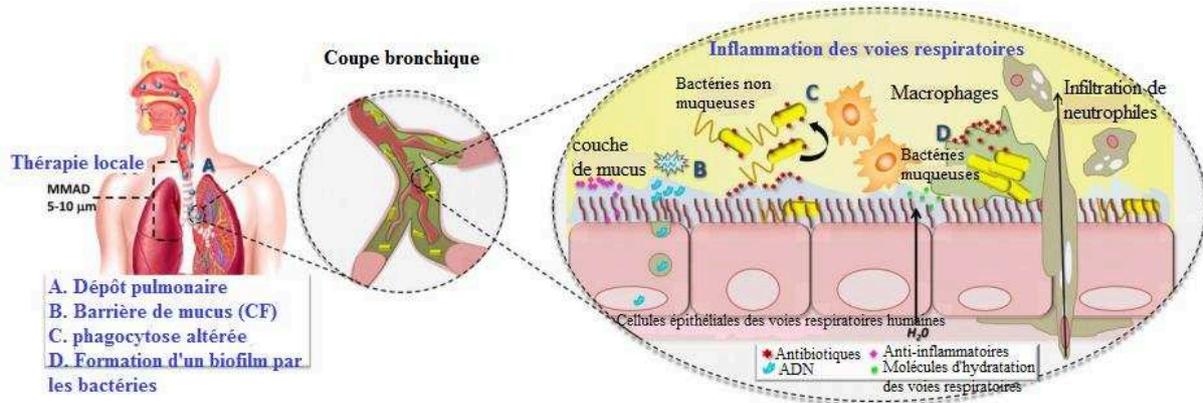


Figure 31 : Les barrières anatomiques et biologiques s'opposant au transfert de gènes dans les poumons de patients mucoviscidosiques. Une fois dans les poumons (A), les complexes doivent pénétrer à travers la couche du mucus (B), échapper aux macrophages alvéolaires (C), interagir avec les cellules cibles (biofilm formé par les bactéries, cellules épithéliales pulmonaires) (D). La dégradation enzymatique est également cruciale pour le devenir des acides nucléiques (modifiée d'après [619]).

4.1.2.1 Dépôt des complexes

L'efficacité des complexes aérosolisés dépend de la dose de particules déposées et de leur distribution dans les poumons. En effet, de nombreux facteurs tels que la taille des particules, le mode et le dispositif d'administration, et l'anatomie du système pulmonaire affectent le dépôt pulmonaire des molécules administrées et par conséquent, leur efficacité thérapeutique [621]. La taille des particules est un des paramètres les plus importants et déterminants pour la délivrance de gènes dans les poumons. En règle générale, les particules ayant un diamètre aérodynamique moyen supérieur à 5 μm, sont localisées principalement dans l'oropharynx et les voies respiratoires supérieures en raison de la force centrifuge. Les particules ayant un diamètre aérodynamique inférieur à 5 μm peuvent être distribuées dans les petites voies aériennes et les bronchioles, et cette pénétration est corrélée avec une bonne efficacité thérapeutique [619]. À la différence, les particules présentant un diamètre allant de 1 à 2 μm sont probablement les plus efficaces pour un dépôt dans les voies aériennes profondes riches en capillaires alvéolaires [619,622]. Les particules d'un diamètre compris entre 0,1 et 1 μm

Chapitre III : Biodistribution

sont la plupart du temps expirées, tandis que les plus fines (< 100 nm) peuvent paradoxalement se déposer dans les voies respiratoires en profitant des mouvements browniens aléatoires [622]. Cependant, dans le cas des pathologies pulmonaires comme la mucoviscidose, des centaines de particularités existent. Elles sont principalement liées à l'obstruction des bronches par un mucus hypervisqueux, au rétrécissement des voies respiratoires, l'inflammation chronique et les infections bactériennes opportunistes [623]. Une corrélation significative entre les paramètres de la fonction pulmonaire indiquant une obstruction des voies respiratoires et le dépôt ainsi que la distribution des complexes après aérosolisation a été mise en évidence chez les patients CF [624]. En effet, chez les patients mucoviscidosiques, contrairement aux sujets sains, les dépôts bronchiques sont augmentés au détriment des dépôts alvéolaires [621,623,624]. De plus, les profils de déposition des particules sont très hétérogènes dans les poumons CF par rapport aux poumons sains. Ainsi, il est difficile de prédire et d'établir un profil de distribution des complexes dans les poumons de patients CF.

4.1.2.2 Mucus

La surface des voies aériennes est recouverte d'une couche de mucus (épaisseur : 5-55µm), sécrétée par les cellules caliciformes et les glandes sous-muqueuses. 90 à 95 % de la masse du mucus est constituée d'eau. Le reste est composé de mucines, d'ADN, de lipides, d'électrolytes, de protéines, de cellules et de débris cellulaires [625,626]. Cette couche de mucus représente une barrière physique qui peut fortement affecter le ciblage et la biodisponibilité des complexes [627,628]. La composition, la quantité ainsi que les propriétés rhéologiques du mucus sont les principaux déterminants de l'absorption et de la distribution des particules dans les poumons. Les mucines constituant le mucus, lui confèrent ses propriétés rhéologiques, principalement sa viscoélasticité qui est essentiellement attribuée aux mucines MUC5AC et MUC5B [629]. Les mucines sont des glycoprotéines de masse moléculaire élevée, avec alternance de régions glycosylées et riches en cystéine, qui jouent un rôle majeur dans l'épuration mucociliaire. Elles sont chargées négativement en raison de l'abondance des groupes carboxyles aux extrémités des réseaux d'enchevêtrement, et forment des glycanes par des liaisons disulfures internes, des enchevêtrements physiques et par des interactions non covalentes [630]. L'hétérogénéité de leurs chaînes de glycanes représente un éventail de récepteurs permettant la reconnaissance et l'adhérence bactérienne, empêchant ainsi les bactéries et les complexes cationiques d'atteindre la surface des cellules épithéliales [631]. En effet, une fois que les particules inhalées ont atteint les voies respiratoires, celles-ci

Chapitre III : Biodistribution

peuvent être piégées par la couche de mucus et éliminées par les mécanismes de clairance mucociliaire [632]. Chez les patients mucoviscidosiques, la surproduction d'un mucus hypervisqueux complique davantage la délivrance de gènes, limitant par conséquent la quantité de particules atteignant les cellules cibles [594,633,634]. La concentration de mucines dans les expectorations provenant d'un sujet normal est d'environ 20 g/L [635]. La concentration de mucines, essentiellement MUC5AC et MUC5B diminue dans les expectorations des patients mucoviscidosiques [636]. Cependant, chez les patients CF où le mucus est beaucoup plus important, il peut y avoir une concentration plus élevée de mucines jusqu'à 47 g/L [637]. Les crachats de patients CF sont caractérisés par une quantité d'eau réduite, des mucines intactes (< 20g/L), ainsi que par des débris cellulaires et bactériens (notamment de l'ADN et de l'actine) pouvant altérer l'intégrité des vecteurs et limiter leur trafic vers les membranes cellulaires [594,618,632,638]. En effet, les biopolymères présents dans les expectorations des patients mucoviscidosiques, forment un réseau de fibres empaquetées avec des mailles de 100 à 1000 nm, ce qui peut permettre une diffusion facile de la plupart des complexes nanométriques [639,640]. Au vue de ces résultats, et afin de réussir à traverser le mucus des patients CF, les particules aérosolisables doivent être d'assez petites (taille « nanométrique » est mieux que la taille « micro »), et avoir une surface hydrophile et neutre pour limiter les interactions avec le mucus [641,642].

Le mucus est éliminé des voies respiratoires profondes par le mouvement des cils (clairance mucociliaire). Ce processus entraîne un auto-renouvellement de la couche du mucus toutes les 20 minutes environ chez un sujet sain [643,644]. Bien que le mucus est éliminé par le mouvement des cils, certaines maladies pulmonaires, tels que la mucoviscidose, sont caractérisées par un changement drastique du taux de clairance mucociliaire [645,646]. En effet, chez les patients mucoviscidosiques le mucus est tellement hypervisqueux que les cils ne parviennent pas à l'éliminer [646]. L'une des approches thérapeutiques contre le mucus hypervisqueux chez les patients CF est l'hydratation, car cela augmente la clairance mucociliaire. L'hydratation du mucus peut être réalisée soit par hydratation directe (par administration d'agents osmotiques comme la solution hypertonique ou le mannitol (Bronchitol™), qui entraîne la mise en place d'un gradient osmotique), soit en utilisant les modulateurs du CFTR pour corriger le dysfonctionnement de transport ionique, et pharmacologiquement en ciblant d'autres canaux ioniques sur les cellules épithéliales des voies respiratoires [94]. (Voir chapitre mucoviscidose : point 7 Traitements de la mucoviscidose et prise en charge page 21).

4.1.2.3 Barrières cellulaires

4.1.2.3.1 Biofilm bactérien

L'inflammation chronique et les infections bactériennes opportunistes, principalement par *Pseudomonas aeruginosa* est l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité chez les patients CF [647,648]. La persistance des infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa* typiques de la mucoviscidose et la résistance aux antibiotiques est due à la formation d'un biofilm de bactéries résistantes, dont la croissance est facilitée par le mucus épais et déshydraté dans les poumons CF (Figure 32) [647–650]. Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobées d'une matrice polymérique composée de polysaccharides, de protéines, d'ADN, et attachés à une surface [651].

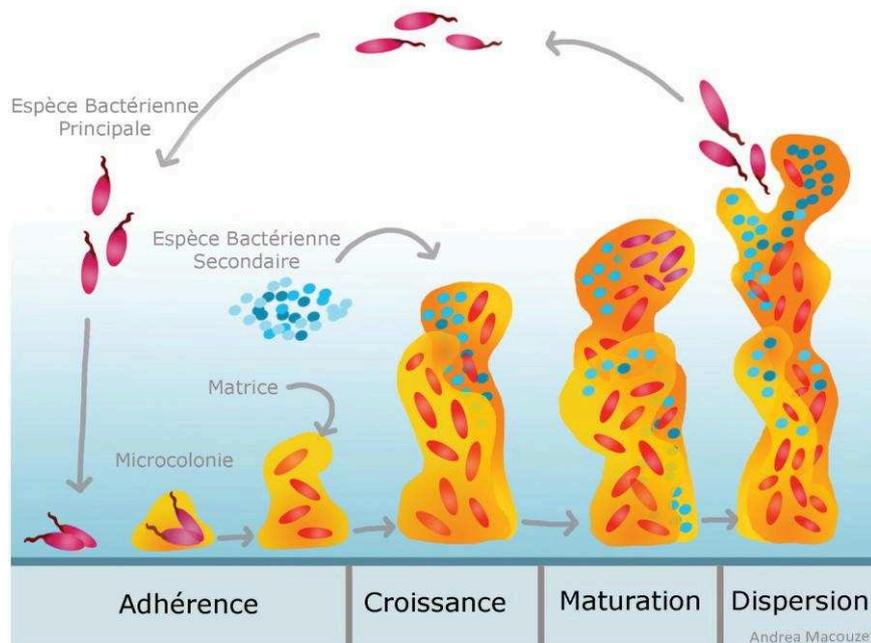


Figure 32 : Étapes de la formation d'un biofilm bactérien (d'après [651]).

La formation du biofilm par des bactéries est reconnue comme un problème majeur dans les infections chroniques. En effet, la pénétration des antibiotiques à travers la couche du biofilm est réduite. De plus, les particules administrées (antimicrobiens ou complexes de délivrance de gènes) peuvent être piégées au sein du biofilm due à des interactions électrostatiques avec les composants de la matrice du biofilm (alginates, polysaccharides,...), diminuant par conséquent la biodisponibilité des antibiotiques à proximité des colonies bactériennes et des complexes de transfection à proximité des cellules cibles [650,652]. À titre d'exemple, chez les patients mucoviscidosiques l'efficacité de la tobramycine inhalée est fortement affaiblie, en raison probablement des interactions électrostatiques de la tobramycine

avec les constituants du biofilm bactérien [653,654]. Ainsi, dans le but de supprimer les interactions non spécifiques des particules inhalées avec le biofilm entourant les bactéries, il est important de développer des molécules ayant des propriétés de surface adéquates (la charge, degrés de lipophilicité, PEG, taille,...) pour améliorer leur efficacité. Par ailleurs, l'accroissement des connaissances sur les principaux composants du biofilm (protéines, récepteurs,...) pourrait être très utile pour la conception de molécules thérapeutiques efficaces [655].

4.1.2.3.2 Cellules épithéliales des voies aériennes (jonctions serrées)

Les systèmes de transfert de gènes doivent par ailleurs traverser la membrane des cellules épithéliales des voies respiratoires et accéder au cytoplasme puis au noyau pour que le gène d'intérêt puisse y être transcrit. Pour améliorer l'accumulation des particules au niveau des cellules cibles, différentes approches peuvent être développées, en utilisant des transporteurs ayant des propriétés de surface adéquates (ex. charge, taille,...) permettant de favoriser les interactions des particules avec les membranes des cellules cibles. Pour cela, des motifs fonctionnels peuvent être greffés à la surface des particules de transfert de gènes afin de développer des constructions de ciblage actif [656]. En effet, l'ajout à la surface d'un ligand reconnaissant par exemple un récepteur surexprimé par les cellules épithéliales des voies respiratoires des patients mucoviscidosiques ou par les bactéries pourraient augmenter davantage la sélectivité des complexes en activant les mécanismes de transport médié par le récepteur. À titre d'exemple, une surexpression des récepteurs TLR 2 et 5 intervenants dans la reconnaissance bactérienne, à la surface apicale des cellules de l'épithélium pulmonaire des patients mucoviscidosiques a été rapportée [657]. Autre point, les voies respiratoires humaines sont bordées de cellules épithéliales liées entre elles par des jonctions serrées apicales. Les jonctions serrées scellent la barrière épithéliale et déterminent le transport paracellulaire de différents composés. De nombreuses données suggèrent que des stratégies visant à ouvrir les jonctions serrées des cellules épithéliales polarisées peuvent améliorer la livraison de gènes dans les cellules pour le traitement des maladies. En effet, il a été rapporté, qu'une interruption transitoire des jonctions serrées avec une solution saline hypotonique et des agents chélateurs tels que l'EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid) ont été utilisées pour améliorer la délivrance des lipoplexes [658]. L'efficacité des vecteurs peut également être améliorée par une pré-administration de molécules telle que la LPD permettant l'ouverture des jonctions serrées, facilitant ainsi l'accès au vecteur à la membrane basolatérale des cellules épithéliales [376]. Il a été démontré que l'infection par *Pseudomonas*

Chapitre III : Biodistribution

aeruginosa provoque la rupture des jonctions serrées entre les cellules épithéliales et par conséquent détruit la barrière épithéliale [659]. En conséquence, les complexes PEI/ADN administrés par voie intratrachéale chez les animaux infectés accèdent au côté basolatéral des cellules et à l'ensemble de l'épithélium, donnant lieu à une augmentation significative de l'efficacité de transfection [659]. Une étude récente, a démontré que les glucocorticoïdes améliorent le fonctionnement de la barrière épithéliale pulmonaire en augmentant la sélectivité paracellulaire des ions Cl⁻ [660]. Ce mode d'action des glucocorticoïdes sur l'épithélium pulmonaire pourrait être bénéfique pour les patients qui souffrent de diverses pathologies.

4.1.2.3.3 Phagocytose (clairance par les macrophages alvéolaires)

Pour la plupart des pathologies pulmonaires, les macrophages alvéolaires représentent un obstacle majeur pour la délivrance de gènes. Cette règle générale ne s'applique cependant pas aux patients mucoviscidosiques, pour lesquels de nombreuses études suggèrent une phagocytose dysfonctionnelle, probablement due à un défaut inhérent dans les neutrophiles et macrophages des voies respiratoires [661]. Des études récentes ont montré que les macrophages présents dans les expectorations des patients atteints de la mucoviscidose expriment des niveaux réduits des récepteurs MARCO (Macrophage Receptor with COllagenous structure) et des récepteurs de mannose (CD206) responsables des liaisons aux bactéries [662]. Le processus d'efferocytose, qui correspond à l'élimination des cellules mortes par les macrophages alvéolaires [663], semble également altéré dans la mucoviscidose, en raison du clivage par l'élastase des neutrophiles des récepteurs de la phosphatidylsérine (l'un des signaux des plus importants de cellules apoptotiques) [664,665]. Ces observations à propos du dysfonctionnement des mécanismes de phagocytose dans la mucoviscidose pourraient fournir un nouvel outil pour une conception améliorée des formulations inhalables, ouvrant la voie à des options thérapeutiques plus efficaces.

4.2 Barrières intracellulaires

L'internalisation cellulaire et le trafic intracellulaire des complexes sont considérés comme une étape clé dans le processus de transfection non virale, car ils régissent l'efficacité du transfert de gènes. Ainsi, le rôle du vecteur est (1) de compacter et de protéger l'ADN afin de faciliter les étapes clé de délivrance de gènes qui sont essentiellement (2) l'internalisation cellulaire, (3) l'échappement endosomal, (4) l'entrée dans le noyau, et (5) l'expression du transgène (Figure 33). En effet, les acides nucléiques peuvent être dégradés s'ils ne sont pas totalement complexés par le vecteur (lipide ou polymère cationiques). Les complexes

Chapitre III : Biodistribution

(lipoplexes ou polyplexes) formés peuvent être éliminés avant d'atteindre la surface des cellules cibles, et peuvent ne pas être internalisés. Après internalisation cellulaire, une partie des acides nucléiques peut être dégradée à l'intérieur des endosomes tardifs et des lysosomes (Figure 33). Une fois libéré dans le cytoplasme l'ADN peut ainsi être dégradé par les DNase cytoplasmiques. De plus, l'ADN transloqué vers le noyau peut ne pas être correctement transcrit ou ne pas être transcrit du tout. Si l'acide nucléique d'intérêt est transcrit, l'ARNm synthétisé peut ne pas produire une protéine fonctionnelle.

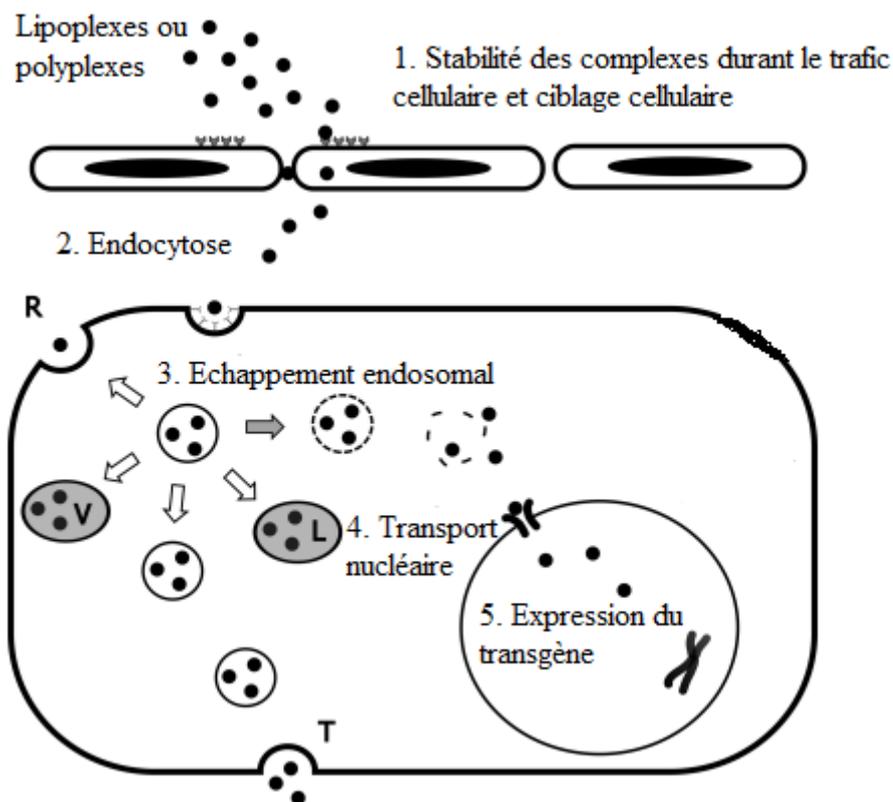


Figure 33 : Barrières intracellulaires de la thérapie génique (*modifiée d'après [666]*). Les lipoplexes ou polyplexes doivent être suffisamment stables pour protéger la séquence d'acides nucléiques mais aussi instables pour libérer cette séquence *pour qu'elle* gagne le noyau des cellules cibles (1). Après administration les complexes doivent être internalisés de manière efficace (2). Après endocytose, les particules doivent s'échapper des endosomes (3), et atteindre le noyau (4). Une fois dans le noyau, le transgène doit être disponible pour la machinerie transcriptionnelle afin de permettre ensuite l'expression du transgène (5). (L : Lysosome, R : Recyclage endosomal, T : Transcytose, V : Vésicule)

4.2.1 L'endocytose des complexes

La membrane plasmique est la barrière entre la cellule et son environnement, et joue un rôle majeur dans la protection des cellules et les interactions avec les différents composants du milieu environnant. La membrane plasmique régule le transport de diverses molécules entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Alors que les petites molécules peuvent être transportées par des pompes ou des canaux, les macromolécules quant à elles nécessitent des mécanismes d'endocytose et/ou d'exocytose pour leur transport cellulaire, c'est-à-dire correspondant à des mouvements membranaires [667]. Les agents thérapeutiques y compris les complexes de transfert de gènes, ont souvent besoin d'être internalisés par les cellules pour atteindre le noyau et produire l'effet thérapeutique attendu. Ceci est une étape critique. L'endocytose des complexes peut se faire par plusieurs mécanismes. En effet, il existe différentes voies d'endocytose, qui sont principalement (Figure 34 et 35): la phagocytose et la pinocytose qui elle même regroupe plusieurs voies d'internalisation (la macropinocytose, l'endocytose clathrine dépendante, l'endocytose cavéoline dépendante et la voie clathrine - cavéoline indépendante [668]). Seules les plus importantes seront décrites ici.

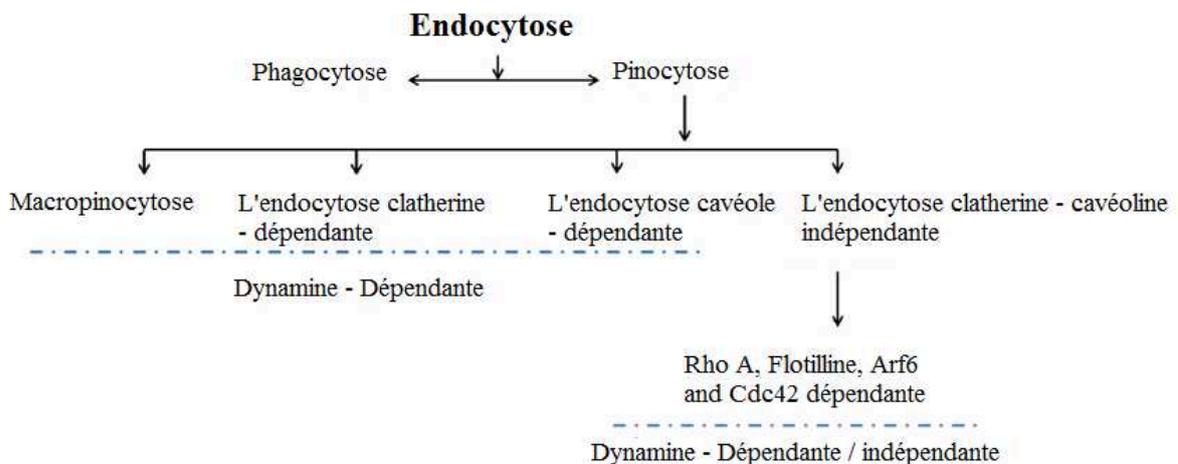


Figure 34 : Classification des voies d'endocytose. L'endocytose est définie comme un processus par lequel les cellules internalisent diverses molécules du milieu environnant. Il existe plusieurs processus qui impliquent différents effecteurs (*D'après* [668]).

4.2.1.1 La phagocytose

La phagocytose est un processus d'internalisation des particules ($> 0.5\mu\text{m}$) par les cellules. La phagocytose est principalement assurée par des cellules spécialisées telles que les macrophages, les neutrophiles et les monocytes pour éliminer les agents pathogènes (ex. bactéries,...) et les débris des cellules apoptotiques. D'autres types cellulaires tels que les

Chapitre III : Biodistribution

cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) [669], les ostéoclastes [670], les cellules endothéliales et les cellules épithéliales pulmonaires [671], utilisent également ce mode d'internalisation. En effet, la phagocytose des lipoplexes et polyplexes par les cellules épithéliales des voies respiratoires et par d'autres types cellulaires a également été mise en évidence [672,673]. L'invagination des membranes cellulaires grâce aux filaments d'actine permet la phagocytose des particules. La vésicule formée se détache de la membrane et forme un phagosome précoce, qui évolue en phagosome tardif puis en phagolysosome après fusion avec les lysosomes, où la particule phagocytée sera dégradée (Figure 35).

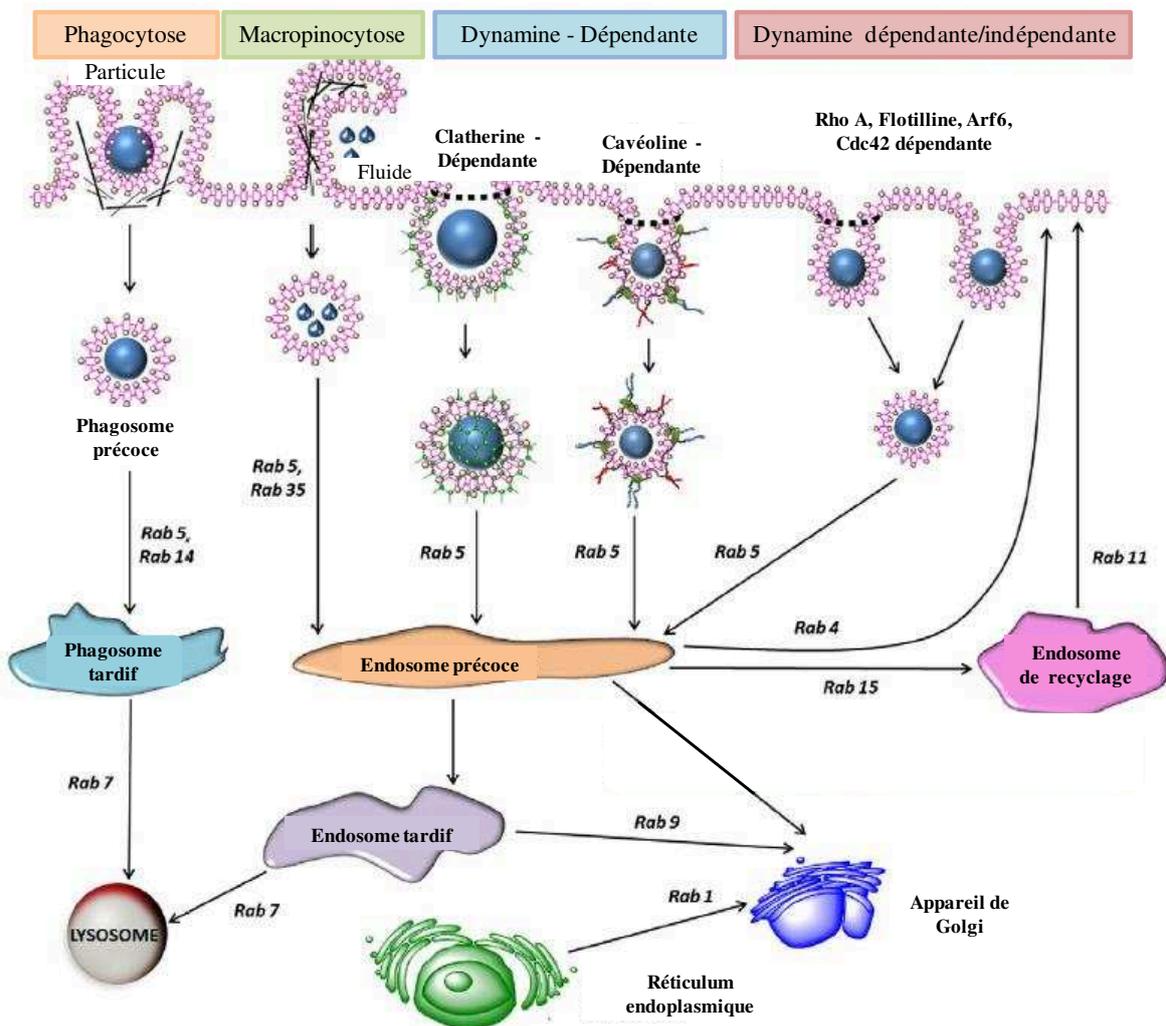


Figure 35 : Vue d'ensemble des processus d'endocytose. Représentation schématique des multiples voies d'endocytose. Les protéines Rab (GTPases) coordonnent la circulation intracellulaire des vésicules, et leur utilisation comme marqueurs des compartiments d'endocytose peut aider à identifier le devenir de la particule internalisée (*modifiée d'après [668]*).

4.2.1.2 La pinocytose

La pinocytose permet l'internalisation des particules de petite taille et des solutés. La pinocytose comprend un certain nombre de voies d'internalisation (Figure 34), dont seules les principales seront décrites ci-après.

4.2.1.2.1 La macropinocytose

La macropinocytose, en comparaison avec la phagocytose, permet l'endocytose de particules plus petites, dans des vésicules appelées **macropinosomes**. Ce mécanisme est essentiellement utilisé par les cellules dendritiques et les macrophages. La macropinocytose a été étudiée comme une voie pour délivrer des molécules bioactives aux cellules. En effet, il a été suggéré que les peptides de pénétration cellulaire riches en acides aminés positifs tels que le peptide cationique TAT dérivé du VIH [674], ou des oligomères d'arginine, sont préférentiellement internalisés par ce mécanisme [675,676], et que les résidus basiques sont nécessaires dans le processus de macropinocytose [674]. Il a également été rapporté que la macropinocytose contribue à l'internalisation des complexes PLL/ADN [677]. Cependant, cette voie altère l'efficacité de la transfection des cellules d'hépatocarcinome humain [677]. Des nanoparticules lipidiques contenant des siRNAs utilisent également la macropinocytose comme voie d'entrée cellulaire *in vitro* et *in vivo* dans le foie de souris [678,679]. Cependant, les auteurs ont constaté que les nanoparticules lipidiques des siRNAs pénètrent dans les cellules par les deux voies d'endocytose ; voie des clathrines et par le mécanisme de macropinocytose [679]. Cette étude montre la complexité du processus d'endocytose et la nécessité de multiples techniques quantitatives et des études approfondies pour élucider les voies impliquées.

4.2.1.2.2 L'endocytose clathrine – dépendante

La voie clathrine – dépendante est un processus complexe et bien décrit, qui permet l'endocytose de molécules par formation de vésicules recouvertes de clathrines (Figure 35). C'est la voie privilégiée concernant l'internalisation des lipides cationiques de transfert de gènes. Elle est commune à toutes les cellules eucaryotes. En bref, le processus comprend la reconnaissance spécifique des particules par les récepteurs membranaires, entraînant la formation de puits recouverts de clathrine dits « mantelés », dans lesquels les complexes sont alors internalisés. La phosphorylation de la dynamine entraîne le détachement de la vésicule de la membrane plasmique. La dynamine est une GTPase, impliquée dans la formation de la vésicule. Il est important de noter que son implication n'est pas spécifique de la voie clathrine – dépendante [668]. La formation des vésicules est un mécanisme actif qui requiert

Chapitre III : Biodistribution

de l'ATP. En effet, la vésiculation s'accompagne de l'activation d'une ATPase à protons à l'origine de l'acidification progressive des vésicules et de la perte du manteau de clathrines. Après la scission de la membrane cellulaire, une gamme de protéines accessoires est responsable du maintien du cytosquelette d'actine et aident à la migration des endosomes [680], et les clathrines sont ensuite recyclées pour former de nouvelles vésicules. Les vésicules lisses ainsi formées fusionnent pour former les endosomes précoces. À partir des endosomes précoces, les particules internalisées sont soit renvoyées à la surface cellulaire, soit transférées dans les endosomes tardifs, puis vers les lysosomes pour dégradation [681–683]. Un gradient de pH se met en place à l'intérieur des vésicules, allant d'un pH de 6,5-6,8 pour les endosomes à un pH de 4,5 pour les lysosomes [684]. La migration des vésicules est sous contrôle des protéines rab (GTPases) spécifiques de chaque type de vésicule. Ainsi, les protéines rab5 sont spécifiques des endosomes précoces alors que les protéines rab7 sont des marqueurs des endosomes tardifs (Figure 35). Le ciblage des complexes utilisant la voie d'endocytose clathrine – dépendante peut se faire par greffage de ligands spécifiques tels que la transferrine et le facteur de croissance épidermique (EGF) [685]. En outre, il a été suggéré que les liposomes anioniques utilisent l'endocytose médiée par les récepteurs des LDL (Low Density Lipoprotein), et des liposomes enrichis en apolipoprotéine E (apo E) ont été conçus pour cibler spécifiquement cette voie d'internalisation [686].

4.2.1.2.3 L'endocytose cavéole – dépendante

Les cavéoles sont des domaines membranaires plasmiques riches en cholestérol et en sphingolipides, caractérisées par leur morphologie distincte (invaginations en forme de puits 60 - 80 nm) [687]. Les protéines de revêtement appelées cavéolines sont des protéines membranaires, tandis que les cavins sont des protéines cytoplasmiques qui forment des complexes hétéromères associés à des cavéoles et régulent leur dynamique et leurs fonctions [668]. Les cavéoline -1 et -2 sont exprimées dans la plupart des types cellulaires, tandis que la cavéoline-3 est principalement exprimée dans le muscle strié (cardiaque, squelettique). Les cavéoline-1 et -3 sont essentielles pour la formation de la cavéole, et le manteau cavéolaire formé comprend quelques 144 ± 39 hétéro-oligomères de cavéolines [688], qui entraînent l'invagination de la membrane. La famille des protéines cavins comprend cavin-1 à - 4. Cavin-1 est nécessaire pour la formation de la cavéole [689], tandis que cavin-2 joue un rôle dans l'invagination de la cavéole [690]. La protéine cavin-3 participe à la formation et au trafic des vésicules cavéolaires [691], et cavin-4 est spécifique du muscle [692]. Cavin-1 co-localise avec la cavéoline-1, mais aucune interaction directe n'a été démontrée. Il a été

Chapitre III : Biodistribution

suggéré que les motifs protéiques cavins s'associent avec les membranes cellulaires par liaison à la phosphatidylsérine [687]. La régulation négative de l'expression de cavin-1 résulte en une perte des cavéoles, et en une diminution des quantités de cavéoline-1 qui deviennent sensibles à la dégradation endolysosomale [689]. En d'autres termes, l'inhibition de l'expression soit de la cavéoline-1 soit de cavin-1 résulte en l'absence des cavéoles dans la plupart des types de cellules [668]. La densité des cavéoles et l'expression des protéines cavéoline et cavin varient considérablement entre les différents types cellulaires et tissus [687]. En effet, les cavéoles sont abondantes dans les cellules endothéliales, les adipocytes, et les cellules du muscle squelettique constituant jusqu'à 50% de la superficie de la surface cellulaire. Dans d'autres types cellulaires, comme les lymphocytes, les tubules proximaux rénaux [693], et de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses couramment utilisées (MCF7 (Michigan Cancer Foundation - 7), et PC3 (Human prostate cancer)) les cavéoles sont indétectables. La densité des cavéoles peut varier au sein même d'une cellule. En effet, la plupart des surfaces apicales des épithéliums ont une faible densité en cavéoles [694]. L'importance des cavéoles comme dispositif de protection de la membrane plasmique, d'organiseurs et capteurs membranaires, et comme voie d'entrée des molécules thérapeutiques a été mise en évidence par les liens entre le dysfonctionnement des cavéoles et les maladies humaines, tels que les dystrophies musculaires et les cancers [687].

4.2.2 L'échappement endosomal

La sortie des endosomes est une étape cruciale pour le devenir et l'efficacité des vecteurs synthétiques. En effet, une fois internalisés, les vecteurs non-viraux se retrouvent piégés dans des endosomes dits précoces, et seule une petite fraction arrive dans le cytosol [695]. Pour atteindre leur cible nucléaire, ils doivent obligatoirement s'échapper de ces endosomes le plus rapidement possible pour éviter la dégradation de l'ADN. Les endosomes précoces évoluent progressivement à l'intérieur des cellules et après une acidification croissante suite à l'action de pompes à protons ATPases – dépendantes, vont se transformer en endosomes tardifs. Ceux-ci fusionnent avec des lysosomes (renfermant des hydrolases, dont des nucléases), dans lesquels le pH est environ égal à 5. Les particules endocytées subissent alors une dégradation par ces enzymes. Ainsi, l'ADN, pour ne pas être dégradé lors de ce processus, doit s'échapper des endosomes avant qu'ils n'aient fusionné avec les lysosomes. Les mouvements de « flip-flop », et l'utilisation de lipides fusogènes dans la formulation des liposomes (ex. DOPE) [696], ou de peptides fusogènes couplés aux lipides ou aux polymères [697], ainsi que le

Chapitre III : Biodistribution

phénomène d'éponge à protons des polymères cationiques [6,12,477,480], sont les mécanismes principalement impliqués.

Les **polymères** cationiques tels que la PEI utilisent le phénomène d'éponge à protons pour s'extraire des endosomes après leur endocytose (Figure 36). Ce phénomène se produit grâce au pouvoir tampon des amines secondaires protonables qui permettent de contrecarrer l'acidification endosomale. À pH endosomal, la protonation des amines secondaires neutralisent les protons générés dans les endosomes par un mécanisme ATPase-dépendant. Ceci entraîne une entrée massive des ions Cl^- et d' H_2O dans les endosomes augmentant ainsi la concentration ionique à l'intérieur des endosomes. La neutralisation des protons s'accompagne d'un phénomène osmotique qui conduit à la déstabilisation de la membrane endosomale et au relargage de leur contenu dans le cytosol. Comme évoqué précédemment, le remplacement de ces amines protonables par des amines quaternaires non protonables entraîne une diminution significative de l'efficacité de transfection de la PEI [483]. L'utilisation de l'histidine dont le noyau imidazole est protonable à faible pH (< 6), permet de générer un effet éponge à protons. En effet, comme mentionné ci-dessus, la PLL (190 résidus lysine) contenant des résidus histidine (90 résidus) améliore significativement l'efficacité de transfection de la PLL normale [516]. D'autres stratégies visant le gonflement des endosomes par un effet de pompes à protons par l'utilisation de polymères cationiques possédant des bases faibles ont également été développées [698]. Depuis, de nombreux polymères contenant des motifs histidine ou imidazole ont été synthétisés [6,12].

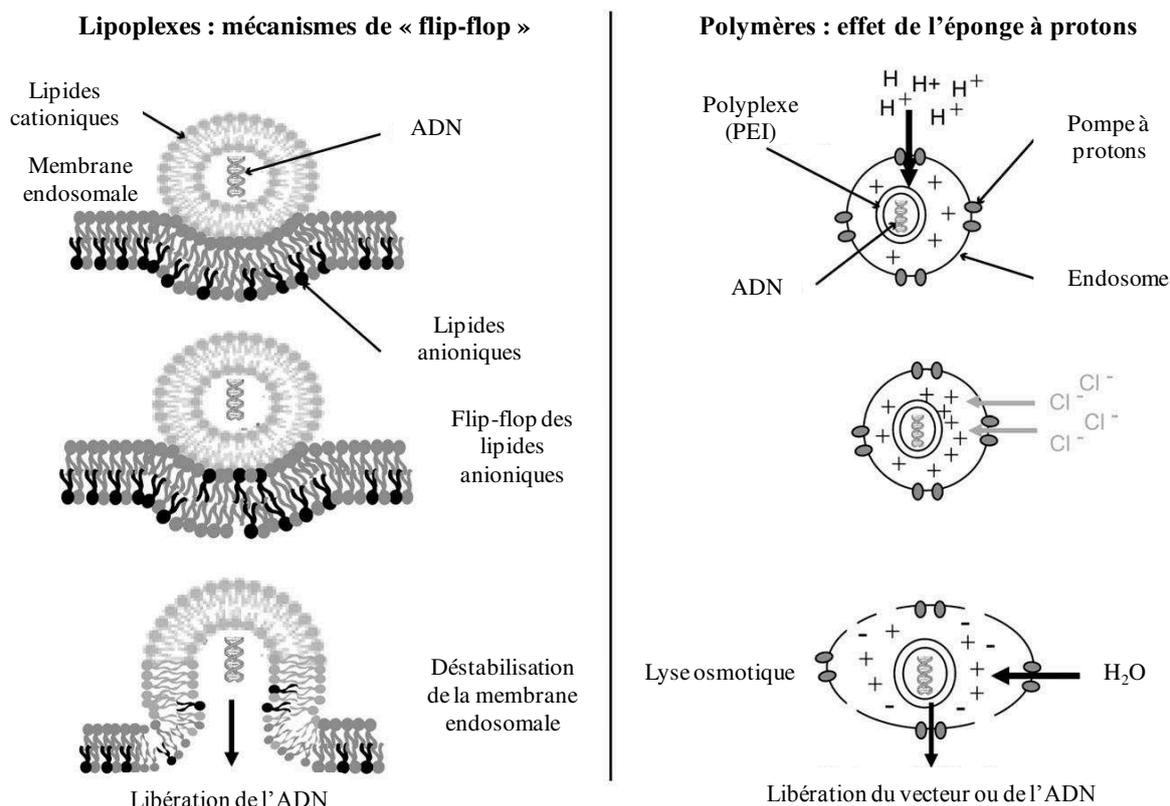


Figure 36 : Représentation schématique des principaux *mécanismes d'échappement* endosomale des polyplexes et lipopolyplexes (*modifiée d'après [598]*).

Concernant les **lipopolyplexes**, leur charge positive peut contribuer à la déstabilisation de la membrane des endosomes et à la libération des acides nucléiques dans le cytoplasme par un phénomène dit de « flip-flop » entre les lipopolyplexes cationiques et les lipides anioniques à la face du feuillet cytoplasmique de la membrane endosomale (Figure 36) [699]. Le lipopolyplexe déstabilise la membrane endosomale en provoquant le mécanisme « flip-flop » des lipides anioniques du côté cytoplasmique qui s'inversent avec ceux de la lumière de l'endosome [700]. L'association des lipides cationiques avec les lipides anioniques entraîne la neutralisation des charges. Ce mécanisme permettrait donc le relargage des acides nucléiques depuis les endosomes dans le cytoplasme [700]. D'autres stratégies visant à améliorer l'échappement endosomal des lipopolyplexes ont été mises au point. L'utilisation de la DOPE un lipide fusogène sensible au pH, dans les formulations des liposomes pour ses propriétés de déstabilisation de la membrane des endosomes, a été largement étudiée [696]. Dans les endosomes, à pH acide (pH5-6) la bicouche lipidique de la DOPE se réorganise en structures hexagonales inverses puis fusionne avec la membrane endosomale en induisant sa déstabilisation et conduisent à la libération des acides nucléiques. L'utilisation des chaînes phytanyles qui favorisent une organisation structurale hexagonale inverse a également été

évaluée avec succès dans notre équipe [617]. Récemment, il a été démontré que les lipopolyplexes contenant de la DOPE présentait un trafic endosomal rapide et efficace accompagné d'une accumulation nucléaire de l'ADNp, tandis que les formulations contenant la DOPC (Dioleoyl phosphatidyl choline) restent piégées dans les compartiments endosomales tardifs [701]. Tout comme pour les polymères cationiques, des lipides comportant des groupements histidines ou imidazoles ont également été synthétisés [12]. Des peptides fusogènes d'origine virale ou synthétique, capables d'induire un échappement endosomal ont été développés et permettent d'augmenter l'efficacité de délivrance de gènes [702–704]. Des liposomes pH sensibles incorporant un noyau imidazole [12,526,531,532,705], ou un motif PEG clivable à pH acide (pH5) [706], ont été synthétisés. Ces composés permettent l'augmentation de la fusogénicité des systèmes de transfert de gènes, et par conséquent leur efficacité de transfection.

4.2.3 Routage intracellulaire et Import nucléaire

L'entrée dans le noyau représente une étape ultime dans le processus de transfection. Peu de données existent sur le devenir de l'ADN (nu ou complexé) à sa sortie de l'endosome. Alors que ceci est sans doute l'étape la plus limitante du transfert de gènes non viral. Un mécanisme de routage intracellulaire des complexes cationiques jusqu'au noyau a été proposé, qui serait tributaire du gradient ionique dans le cytosol. En effet, les polycations suivraient un gradient d'affinité polyanionique en passant par les tubulines, puis l'actine pour atteindre des zones riches en acides nucléiques [707]. L'hypothèse la plus probable est que les complexes cationiques utilisent le cytosquelette pour diffuser dans le cytoplasme [708,709]. En effet, le cytosquelette constitué de microfilaments d'actine, de filaments intermédiaires, de microtubules et de protéines motrices (myosine, dynéine et kinésine) permet le déplacement de nombreux composés à travers le cytosol. Il a été d'ailleurs montré que l'adénovirus (sérotypé 5) et le virus HIV utilisaient la dynéine et les microtubules pour migrer vers le noyau [710,711]. Ainsi, l'utilisation d'un vecteur présentant un ligand de la dynéine pourrait permettre un transport cytosolique rapide de l'ADN d'intérêt vers le noyau [712]. Suh et al. ont également montré que les polyplexes (taille < 100 nm) de PEI 25 KDa étaient transportés du cytoplasme vers le noyau le long des microtubules grâce aux protéines motrices du cytosquelette [713]. En fait, ce sont les vésicules endosomales contenant ces nanocomplexes qui seraient transportés le long des microtubules, et une fois à proximité du noyau, les nanocomplexes s'échapperaient de ces vésicules [713]. L'importance du cytosquelette a également été démontrée après transfection par électroporation, apportant cette fois - ci un

Chapitre III : Biodistribution

effet bénéfique pour le transfert de gènes, en facilitant l'invagination de la membrane plasmique des cellules et l'internalisation des complexes [714]. Récemment, il a été montré que lorsque les cellules (CHO : Chinese Hamster Ovary) sont transfectées avec la formulation DOTAP-DOPC, la majorité de l'ADNp se retrouve piégés dans les lysosomes, limitant par conséquent l'efficacité de transfection du DOTAP-DOPC [715]. En parallèle, celles transfectées avec les lipoplexes contenant du DC-Chol – DOPE présentaient un échappement endosomal efficace, probablement en raison de la DOPE et des molécules de cholestérol, qui sont capables de déstabiliser la membrane endosomale [715]. Ces résultats suggèrent que l'ADNp est délivré au noyau de manière synergique: le processus nécessite à la fois l'activité membranaire fusogénique de l'enveloppe du vecteur et l'utilisation de lipides ayant une capacité intrinsèque de rupture endosomale [715]. Il a été montré que seul 0.1% d'ADN sont transcrits après une microinjection dans le cytoplasme [716,717]. À l'inverse, une microinjection intranucléaire des lipoplexes n'aboutissait pas à une expression du transgène [717,718]. Ceci suggère donc que l'ADN doit arriver sous forme libre (dissocié du vecteur) dans le noyau pour y être transcrit. Cependant, une autre étude a montré que l'ADN pouvait accéder à la machinerie transcriptionnelle, alors qu'il est encore complexé à la PEI [481]. La translocation nucléaire des complexes non viraux est facilitée par la rupture de la membrane nucléaire pendant la division cellulaire [719,720]. Bien qu'étant faible, la transfection des cellules quiescentes est toutefois possible. En effet, en absence de mitose les particules d'ADNp pénètrent dans le noyau à travers les pores nucléaires (NPC : Nuclear Pore Complex) [721]. Selon le type cellulaire, seulement 1 à 10% des plasmides internalisés par les cellules se retrouvent dans le noyau [722]. En effet, si les petites particules d'ADNp sont capables de traverser les pores nucléaires, celles d'une taille supérieure à 2 kb restent bloquées dans le cytoplasme [723]. L'amélioration du transport nucléaire des ADNp est donc une étape importante pour l'optimisation de l'efficacité transfection.

Parmi les stratégies mises au point pour améliorer l'import nucléaire des acides nucléiques à travers le NPC, l'incorporation des séquences NLS (Nuclear Localization Signal) dans les formulations est la plus étudiée. Utilisés *in vivo* dans le cadre d'une approche d'immunothérapie, les ADNp contenant des séquences NLS donnent lieu à une meilleure expression du transgène chez les souris avec une augmentation des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) [724]. Il a été montré que l'import nucléaire des ADNp à travers le NPC est un processus séquence-spécifique, médié par des éléments eucaryotes dits DTS (DNA Nuclear Targeting sequences) (Figure 37) [725–727]. Ce type de séquences permet l'interaction avec les facteurs de transcriptions tels que NFkB. Les facteurs de transcription

Chapitre III : Biodistribution

étant fonctionnel dans le noyau ils possèdent leurs séquences NLS, qui peuvent être reconnues par les importines, protéines assurant le transit des facteurs de transcription et des séquences nucléiques associées vers le noyau. Ainsi, l'utilisation de plasmide contenant une séquence (72 pb) de l'enhancer SV40 permet l'entrée des ADNp dans le noyau, alors que le plasmide contrôle (dépourvu de la séquence de l'enhancer) reste dans le cytosol jusqu'à une éventuelle division cellulaire [725,728]. Cette séquence, dite séquence de ciblage nucléaire nommée SV40 ADN DTS, a montré son efficacité dans toutes les lignées cellulaires testées, y compris les cellules primaires dérivées de singe, de rat, de souris, de hamster, de poulet, et d'origine humaine, ainsi qu' *in vivo* [729–733]. Autres séquences DTSs développées, la séquence 3NF, consiste en une triple répétition de la séquence d'interaction avec le facteur anti-apoptotique NFkB [15,734]. La répétition des motifs 3NF placés en amont et en aval de la cassette d'expression du transgène augmente considérablement l'import nucléaire et l'expression du transgène [15,734].

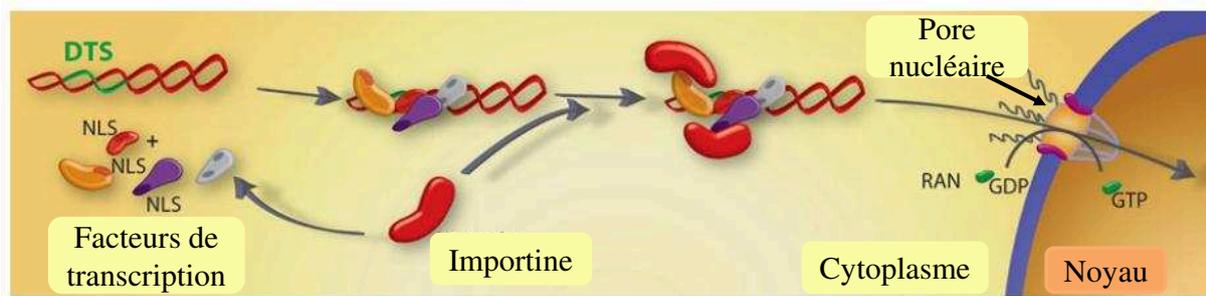


Figure 37 : L'import nucléaire des plasmides (modifiée d'après [727]). Les facteurs de transcription ainsi que d'autres protéines nucléaires entrent normalement dans le noyau grâce aux interactions entre leurs séquences NLS et les importines. Cependant, si des plasmides contenant certaines séquences qui agissent comme des échafauds pour des facteurs de transcription et d'autres protéines de liaison à l'ADN tels que les DTS sont déposés dans le cytoplasme au cours de la transfection. Ils peuvent former des complexes avec ces protéines, reliant ainsi les NLS à l'ADN. Certains NLS peuvent adopter une conformation qui leur permet d'interagir avec les importines pour le transport du complexe protéine-ADN dans le noyau par le biais du complexe du pore nucléaire.

L'ensemble des résultats montrent que l'étape de l'import nucléaire reste l'étape la plus limitante du transfert de gènes non viral. Ils laissent penser que d'autres mécanismes indépendants des importines permettant l'entrée nucléaire existent. Des études plus approfondies sont nécessaires pour mieux comprendre le processus d'import nucléaire des

complexes synthétiques de transfection selon le type du vecteur et du plasmide utilisés, le modèle cellulaire,...etc.

4.2.4 L'expression du transgène

L'expression du transgène est fondamentale pour le transfert de gènes. Une fois dans le noyau l'ADNp doit être transcrit en ARNm. Cette étape nécessite une polymérase qui se fixe sur le promoteur du plasmide. Ainsi, le choix du promoteur est un critère important à prendre en considération lors de la construction du transgène. En effet, la nature du plasmide a un impact direct sur le niveau et la durée de l'expression du transgène d'intérêt [546,735]. De nombreuses études suggèrent que le promoteur du CMV permet une meilleure efficacité de transfert de gènes (essentiellement *in vivo*), que les autres promoteurs tels que le promoteur du SV40, thymidine kinase (TK) [600]. Cependant, l'expression du transgène sous la dépendance de promoteurs viraux, (ex. CMV), est généralement élevée mais très transitoire. L'extinction d'expression serait due au silençage épigénétique du promoteur en raison de la présence des motifs CpG, dont les cytosines subiraient une méthylation à l'intérieur des cellules [736,737]. L'inflammation induite par les motifs CpG à la suite de leur reconnaissance par le système immunitaire (TLR9) [579,615], aurait également un impact négatif sur l'expression du transgène [738–741]. Cela a amené à étudier l'expression du transgène obtenue lors de l'utilisation de différents promoteurs cellulaires voire de constructions hybrides d'éléments régulateurs. Ces recherches ont permis d'identifier le promoteur hybride associant des éléments régulateurs du virus CMV et du promoteur cellulaire hCEFI comme candidat intéressant pour améliorer l'expression des ADNp [735,742]. Par ailleurs, la mise au point de plasmides dépourvus des dinucléotides CG a permis non seulement de réduire l'inflammation mais a conduit aussi à une expression prolongée du transgène dans les poumons de souris [557]. D'autres stratégies visent à munir le plasmide de séquences nucléotidiques permettant de favoriser son import nucléaire.

Chapitre III : Biodistribution

Revue bibliographique

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur le développement et la biodistribution des vecteurs synthétiques après une administration systémique. Ceci m'a emmené à réaliser une étude bibliographique sur le sujet, donnant lieu à une revue publiée dans *Biotechnology Journal*. En effet, la délivrance de gènes constitue une thérapie émergente pour le traitement de diverses pathologies. Les modes d'administration et les vecteurs utilisés sont choisis selon que le but du traitement soit la production d'une protéine active, soit le remplacement d'un gène manquant ou inactif. Il existe différentes voies d'administration ; principalement l'injection systémique et la voie locale (inhalation, aérosolisation,...). Ainsi, comme pour tout médicament, le développement de systèmes de délivrance de gènes non-viraux nécessite l'adaptation de leur formulation à la voie d'administration afin d'optimiser la délivrance et de surmonter les obstacles biologiques liés à la voie d'administration choisie. Pour cela, il est donc nécessaire d'étudier les profils de biodistribution tissulaire, ainsi que les voies d'élimination des complexes. En effet, en fonction de la voie d'administration, le parcours suivi par les molécules administrées est différent, indépendamment du tissu cible.

Review

Synthetic vectors for gene delivery: An overview of their evolution depending on routes of administration.

Nawal Belmadi¹, Patrick Midoux³, Pascal Loyer^{2,5}, Catherine Passirani⁶, Chantal Pichon³, Tony Le Gall^{1,2}, Paul-Alain Jaffres^{2,4}, Pierre Lehn¹ and Tristan Montier^{1,2,7}

¹Unité INSERM 1078; Université de Bretagne Occidentale; Université Européenne de Bretagne, Faculté de Médecine, Brest, France

²Plateforme SynNanoVect, Biogenouest, SFR 148 ScInBioS; Université de Bretagne Occidentale, Faculté de Médecine, Brest, France

³Centre de Biophysique Moléculaire; CNRS UPR4301; Université d'Orléans, Orléans, France

⁴UMR CNRS 6521; Université de Bretagne Occidentale; Université Européenne de Bretagne, Faculté des Sciences, Brest, France

⁵Unité INSERM 991; Université de Rennes 1, Rennes, France

⁶Unité INSERM 1066; Université d'Angers, Angers, France

⁷Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité, CHRU de Brest, Brest; DUMG, Université de Bretagne Occidentale, Faculté de Médecine, Brest, France

Nucleic acid delivery constitutes an emerging therapeutic strategy to cure various human pathologies. This therapy consists of introducing genetic material into the whole body or isolated cells to correct a cellular abnormality or dysfunction. As with any drug, the main objective of nucleic acid delivery is to establish optimal balance between efficacy and tolerance. The methods of administration and the vectors used are selected depending on whether the goal of treatment is the production of an active protein; the replacement of a missing or inactive gene; or the combat of acquired diseases, such as cancer or AIDS. In that sense, synthetic vectors represent a valuable solution because they are well characterized, their structure can be fine tuned, and their potential toxicity can be reduced, since toxicity depends on the composition of the formulations. Here we review various synthetic vectors for gene delivery and address the question of their biodistribution as a function of the route of administration. We highlight the modifications to vectors structure and formulations necessary to overcome the major hurdles limiting the effectiveness of nucleic acid therapies.

Received 15 DEC 2014
Revised 26 FEB 2015
Accepted 07 APR 2015

Keywords: Biodistribution · Cellular barriers · Gene delivery · Routes of administration · Synthetic vectors

Correspondence: Prof. Tristan Montier, Unité INSERM1078; Université de Bretagne Occidentale, Faculté de Médecine, 22 rue Camille Desmoulins, 29200 Brest, France

E-mail: tristan.montier@univ-brest.fr

Abbreviations: AAV, adeno-associated virus; BGTc, bis guanidinium-tren-cholesterol; BSV, Brest synthetic vector; CDplexes, CycloDextrin complexes; CF, cystic fibrosis; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; Chol, cholesterol; CRISPR/Cas, clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein system; DC-Chol, 3 [N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol; DMRIE, 1-2 dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethyl ammonium bromide; DOGS, dioctadecylamine-glycine-spermine; DOPC, dioleoyl phosphatidyl

choline; DOPE, dioleoyl phosphatidylethanolamine; DORIE, bromide of dimyristyloxypropyl-dimethyl hydroxyethylammonium; DOSN, dioleoyl succinyl ethylthionomycin B; DOSP, dioleoyl succinyl paromomycin; DOTAP, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl sulfate; DOTMA, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride; DSPE-PEG, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethyleneglycol; EphA2, ephrin type-A receptor 2; GAL, Galactose; GL67, N4-spermine cholesterylcarbamate Genzyme Corporation; HDL, high density lipoprotein; HLV, hydrodynamic limb vein; IV, intravenous injection; LNCS, lipid nanocapsules; LPD, lipopolyplexes; IPEI, linear polyethyleneimine; MMS, multimodular systems; MW, molecular weight; NA, nucleic acids; PEG, polyethylene glycol; PEI, polyethyleneimine; γ-PGA, gamma-polyglutamic acid; PLL, poly-L-lysine; rHDL, reconstituted high density lipoprotein.

1 Introduction

The absence or alteration of a gene modifies the structure and impairs the function(s) of the resulting protein(s) leading to hereditary pathologies like cystic fibrosis (CF) or Duchenne muscular dystrophy (DMD), as well as acquired pathologies such as cancers or infectious disorders. If the symptoms of these lethal diseases are treated, the genetic roots of the pathology could be fought by delivering a nucleic acid (NA) sequence into the nucleus of the affected cells to increase or inhibit the production of the proteins responsible or implicated in the pathology. Thus, genomic treatment using NA as drugs is proposed as a therapeutic solution to treat several human diseases. In addition to the correction of transmitted or acquired genetic defects, this approach might be used for other applications including: (i) functional gene studies [1]; (ii) production of relevant proteins; or (iii) immunization against cancer cells and infectious pathogens [2]. In addition, RNA interference (RNAi) also offers many possibilities for gene delivery through the inhibition of genes particularly those implicated in cancer [3].

However, introducing genetic material into cells requires efficient and safe vectors. The development of well tolerated and efficient gene transfer procedures requires precise knowledge about structure/activity relationships as well as the environmental and cellular hurdles faced by the transfer vehicle. NA are anionic as well as hydrophilic macromolecules, and cell membranes are also negatively charged. Electrostatic repulsions therefore exclude spontaneous contact of NA with the cell surface, limiting the ability of NA to cross the plasma membrane. To enable NA to cross the plasma membrane, the vector must be able to compact NA, masking its charge and protecting the NA in its journey from the point of administration through the cytoplasm and into the nucleus. The success of gene transfer, especially *in vivo*, is also related to the behavior of the complexes between the point of injection and the cellular target. An ideal vector should be more specific to the target tissue, nonimmunogenic when NA readministration is required, and should have, whatever the administration route, as few side effects on nontarget organs as possible. Finally, once released into the cytoplasm of the targeted cells, NA constructs must be capable of: inducing a significant and functional expression of the therapeutic transgene as long as is necessary; or blocking the translation of the specific proteins. Many approaches to gene therapy exist and they can be divided into two groups: (i) recombinant viral vectors; and (ii) nonviral carriers which can be further divided into chemical and physical approaches. Recombinant vectors utilize the natural ability of viruses to penetrate into host cells to transfer and replicate their genome (DNA or RNA). As a consequence, different types of recombinant viruses have been used. Among them, many viral families exist such as: adeno-associated virus (AAV); ade-

novirus; retrovirus including lentivirus; herpes virus; poxvirus; and other viral vectors. The principle of their use consists in deleting the viral sequences that encode essential proteins implicated in the pathogenic infection cycle, and retaining those whose function is to build the viral particle and ensure cell infection. The NA sequence of the virus is partially substituted by the transgene and therefore requires the use of packaging cells. Due to their high capacity for infection, the majority of clinical trials conducted to date are based on these viral vectors. Since the first clinical assay in 1989, ~2142 clinical evaluations have been conducted [4], [<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>]. As an example, about six clinical trials for CF gene therapy with AAV2-CFTR vectors have been undertaken. After showing a good tolerability and providing some encouraging results on a few patients, the larger clinical trial (~100 patients) based on repeated administrations via aerosol failed to confirm these expectations. At present, no statistically significant improvement in lung function has been reported regardless of the viral vector used [5]. During the same period, Goyenvalle et al. [6] demonstrated the exon-skipping strategy for the development of innovative therapies for DMD. Subsequently, an ambitious development program, currently at the preclinical stage, has been embarked upon by Genethon in collaboration with the Institute of Myology (Paris, France), Genosafe Atlantic and Gene Therapies (Nantes, France). This program is based on the use of an AAV vector carrying a transgene promoting the skipping of exon 53, leading to the production of "quasi dystrophin" in the patient's muscle. Locoregional intravenous administration allows the treating of entire limbs, as was demonstrated in the preclinical studies [<http://www.afm-telethon.fr/>]. Many other viruses continue to be explored in gene therapy approaches that are described in the literature. For example, tests involving the herpes simplex virus [7], or the Sendai virus, particularly due to their tropism for the respiratory tract [8] are still running for use in CF applications. However, many problems persist in terms of bioproduction, immunogenicity related to their readministration [9], safety, reproducibility, and potential oncogenicity. These drawbacks have led to the development of alternatives, such as synthetic gene delivery systems. They are mostly represented by cationic lipids and cationic polymers designed to allow NA protection, target a specific cell, and promote cell delivery. Some synthetic gene delivery systems are inspired by natural molecules capable of interacting with anionic phosphates and compacting NA constructs to generate self assembling nanoparticles [10].

Compared to viral vectors, synthetic carriers have many advantages, such as well controlled production, high stability, low immunogenicity, low production cost, and the size of the transgene they can carry is, in theory, limitless. Moreover, structures and formulations are well defined and can be fine tuned to overcome obstacles and

improve their efficacy. These features make synthetic gene delivery systems very attractive for gene transfer [11]. However, their capacity to transfer NA is still lower in comparison to virus derived vectors [9]. Moreover, the comparison of different synthetic vectors is difficult. Indeed, their transfection efficiency depends greatly on: (i) the carrier chemical construction (such as geometric form, cationic domains, type and size of lipid anchors, the nature and length of the linker); (ii) the charge ratio or N/P used to form NA-lipid or NA-polymer complexes; and (iii) on the characteristics of the associated helper lipid [12]. In addition, many factors relating to the passage through cellular barriers, as well as the extracellular environment correlating to the organs and tissues encountered, have also been shown to have a negative impact on the efficiency of synthetic vectors. This manuscript reviews the current and emerging ideas about synthetic carriers for the transfer of NA constructs both in vitro and in vivo. Secondly, we discuss environmental and cellular obstacles encountered during the gene delivery procedure. Lastly, we focus on biodistribution and elimination of these molecules, and the indispensable adaptation of their formulation related to the routes of administration in order to optimize their efficiency and preserve their tolerance.

2 Structural evolution of synthetic gene delivery systems

2.1 Use of cationic lipids in gene delivery systems

Many cationic lipids have been employed as synthetic carriers for gene therapy, but only a handful of these compounds have been investigated in clinical trials [13]. Cationic lipids are amphiphilic organic molecules, typically made up of three domains: a cationic head that allows binding to NA; a hydrophobic motif; and a linker separating these two elements [13]. In aqueous solution, the fatty acyl chains associate with each other to form particles such as micelles or liposomes. The hydrophobic domain usually consists of two kinds of lipophile structure: aliphatic chains; or a core of cholesterol or any other steroid. The linkers between the two domains are composed of ether, ester, carbamate, or amide bonds that influence the level of biodegradability of the carrier [12, 14]. Many lipids have been synthesized to increase transfection effectiveness in vitro and in vivo assays, and limit cytotoxicity. Moreover, additional elements, such as zwitterionic lipids or fusogenic molecules, can be added to the formulations to modulate the stability of the complex, while addition of ligands can modulate specific cell targeting [15]. The structural and functional knowledge of natural membrane phospholipids, and the use of phosphorus colipid zwitterionic DOPC (dioleoyl phosphatidylcholine) or DOPE (dioleoyl phosphatidylethanolamine)

have suggested that biological phospholipid derivatives could be excellent candidates for synthetic gene transfer systems. Starting with an initial formula mimicking phospholipids of the membrane, several structural changes have been reported, the transfection efficiencies of the resulting formulations have been assessed initially on cell lines and subsequently in animals [10]. In this way several groups of vectors have been developed by different research teams. For example, an increase in linker length affects the head group's charge and therefore its relative position to the bilayer/water interfaces. This probably affects the NA-bilayer surface organization and consequently, the lipoplexes' self arrangement, modulating the intracellular fate of complexes [16]. Cationic compounds represent a cross disciplinary research domain where pharmacists, cell biologists, and biochemical engineers interact. Cationic lipids are classified into three main families: monocationic lipids; polycationic amphiphiles; and cholesterol derivatives. This classification has the advantage of allowing a chronological description of the vectors evolution.

2.1.1 The development of monocationic lipids for use in gene delivery systems

The best known monocationic lipid is DOTMA (*N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium chloride) which was the first cationic lipid designed by Felgner et al. [17]. It is composed of two monounsaturated chains (oleic) and a quaternary ammonium cationic head, connected by a 2,3-di-propyl-oxy spacer [17]. To facilitate its fusogenicity, this lipid is formulated using equal quantities of the zwitterionic DOPE colipid, commercially available under the trade name Lipofectin® (Invitrogen).

Subsequently many analogues of DOTMA have been synthesized. The transfection capacity was enhanced by modulating the length of aliphatic chains and the linker arrangement. In DOTAP (*N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methyl sulfate), the spacer was modified by replacing the ether motif with ester functions leading to reduce cytotoxicity [18, 19]. Both lipids have a comparable transfection efficiency, but DOTAP, due to its ester type spacer, is more easily biodegradable and therefore less toxic. Meanwhile it was found that a more stable spacer of the ether type allows higher in vivo transfection efficiencies [18]. In fact, it has been shown, that complexes based in DOTAP/DOPE transfect murine fibroblast cells (LTA) with efficiencies two- to four-fold greater than DOTMA/DOPE complexes [Raymond, M. and Gros, P., personal communication]. Other derivatives have also been synthesized such as DORIE (bromide of dimyristyloxypropyl-dimethyl hydroxyethylammonium) that differ from DOTMA with the substitution of a methyl group by a hydroxypropyl group at the quaternary amine of the polar head. DORIE exhibits an in vitro transfection efficacy 2 to 3 times superior to that of DOTAP [19]. These reports highlight that the supramolecular organization of

cationic carriers significantly influence their effectiveness. Moreover, the biophysical characteristics of liposome surfaces are essential for their transfection capacity. It has been shown that addition of up to 30 mol% of DOTAP does not affect the quantity of bound water at the level of the sn₁ carbonyl function, resulting in an augmentation of packing of phospholipid headgroups [20]. It has also been shown that the use of DOTAP/DOPE/cholesterol/DSPE-PEG/RGD cationic liposomes enhance cytoplasmic localization of siRNA in MCF7 cells [21].

Although, many families of cationic lipids have been described in recent years, scientific groups continue to investigate appropriate structural combinations in order to increase transfection efficiency without causing additional toxicity [10]. Our own experiments with the phosphonolipids family, showed that the substitution of an ammonium with a phosphonium or an arsonium polar head results in increased efficacy (up to seven times depending on the cell model used) and reduced toxicity. As an example, the lipophosphoramidate, KLN47, with an arsonium polar head group and two oleic chains gave higher transfection results in mice lungs after intravenous injection (IV) than the homologous ammonium compound GL73 [22, 23]. Modifications effecting the nature of the fatty chains were also performed. Among these compounds, BSV4, an arsonolipophosphoramidate characterized by two linoleic chains (double unsaturations), was more effective for the transfection of murine lung tissues after intravenous administration than the homologous compound bearing a single unsaturation (KLN47) [24]. Indeed, in harvested lungs, luciferase expression achieved $(1.43 \pm 0.59) \times 10^5$ and only $(4.60 \pm 2.58) \times 10^3$ RLU/mg total protein, after treatment with BSV4 and KLN47, respectively [24]. Replacement of oleic or linoleic aliphatic chains (KLN47 and BSV4, respectively) by phytanyl chains permitted the formation of more fusogenic type structures identified as inversed hexagonal phases without the addition of DOPE, significantly improving *in vivo* transfection efficiency [25]. Neutral lipophosphoramides (colipids) bearing an imidazole motif have also been synthesized, their association with various cationic lipids (DOTAP and phosphoguanidines) resulted in transfection efficiencies up to 100 times higher than the same compounds formulated with DOPE [26].

Addition of peptides to lipidic formulations has also been investigated. The most effective results in A549 (human alveolar epithelial cells) are obtained with polypeptides containing branched Arg-rich, or linear Lys-rich peptides. Lipopolyplexes, firstly used by Huang et al. [87, 167], are described as ternary complexes consisting of a liposome, a cationic polymer and a NA construct. It has been found that lipopolyplexes with branched Arg-peptides were more efficient than lipopolyplexes with linear Arg-containing sequences. Moreover, lipopolyplexes with linear Lys-containing sequences are more effective than the lipopolyplexes with branched Lys-containing

peptides. This can be explained by differences observed in the formation of DNA complexes between Arg-rich and Lys-rich peptides [27]. The structure of the peptide sequence also influences formation of complexes with NA. Therefore, several strategies are being explored (such as the addition of fusogenic colipids or peptides, use of acid-sensitive liposomes or liposomes with a buffer capacity), and some teams focus on the intrinsic properties of liposomes to form supramolecular structures to facilitate cell penetration and endosomal escape. Since the work first describing various families of nonviral vectors, numerous important structural modifications or combinations have been explored in order to correlate chemical formulation with the ability to transfect.

2.1.2 The development of polycationic lipids for use in gene delivery systems

Polycationic lipids form liposomal structures with a surface charge density greater than liposomal structures based on monocationic compounds. Polycationic lipids can efficiently condense NA and the complexes they form exhibit improved stability. The polar head of polycationic lipids is generally derived from a multivalent natural compound (such as spermine or aminoglycosides), which increases their biodegradability. Consequently, a lower amount of lipid is required for optimal condensation of NA and in general polycationic lipids have been found to be less toxic and more effective than monocationic lipids. The first polycationic lipid, DOGS (dioctadecylamine-glycine-spermine) was developed in 1989 by Prof J.-P. Behr and co-workers [28]. It is characterized by a polar head of spermine, which is connected through a spacer motif that includes a metabolizable peptide bond between two chains of saturated C18 fatty acids. The polycationic lipid (DOGS /DOPE) is marketed under the name Transfectam® (Promega), and allows high transfection efficiencies in eukaryotic cells, due to the fusogenic properties of DOPE [29]. Even in the absence of a colipid, DOGS is effective. It has been demonstrated that DOPC is a more efficient colipid compared to DOPE [30]. Indeed, with DOPE the internalization of the resulting complexes takes place principally by fusogenic interactions between the complexes and membranes, while in the presence of DOPC endocytosis facilitates lipoplex uptake [30].

Subsequently a variety of polycationic lipid analogues have been developed. Worth a mention is DOSPA (2,3-dioleyloxy-*N*-2-(sperminocarboxamido) ethyl-*N,N*-dimethyl-1-propanamium) formulated with DOPE and marketed under the name Lipofectamine® (Invitrogen). In this family of compounds, the polar head of spermine is not fully protonated at physiological pH, it may have a function in the cytoplasmic uptake of polycationic complexes as it has been shown for Polyethyleneimine (PEI) [31]. Finally, it is worth noting the importance of spacer polycationic lipid derivatives of spermine. Indeed, as the polar head binds to DNA at the minor groove of the double helix, the

linker needs to be long enough to avoid steric hindrance between the DNA and the hydrophobic cluster of the cationic lipid [29]. Polycationic lipids that utilize a polar head similar to natural aminoglycoside compounds have also been synthesized. They all consist of a 2-deoxystreptomycin core, disubstituted on both the 4, 6 positions (tobramycin and kanamycin) or 4, 5 positions (paromomycin and neomycin) with saccharide units that have hydroxyl groups and amines.

The first lipids containing a polar head derived from aminoglycosides were synthesized by the team of J. M. Lehn in 2002. For instance, KanaChol consists of a polar head kanamycin and a cholesteric hydrophobic anchor [32]. Derivatives whose cholesteric part were replaced by aliphatic chains, showed a significant ability for NA transfer in cell lines or in mouse lungs after intranasal administration [33]. For efficient delivery of RNAi, polycationic lipids characterized by a variety of aminoglycosides in their head groups were synthesized and then analysed for specific interaction with RNA. The derivatives obtained were DOST (dioleoyl succinyl tobramycin), DOSK (dioleoyl succinyl kanamycin A), DOSN (dioleoyl succinyl ethylthioneo-mycin B) and DOSP (dioleoyl succinyl paromomycin). These derivatives have respectively three, four and six protonated amines at the polar head [34]. Results showed that the most active complexes for gene silencing were DOSP and DOSN, as they had a greater destabilizing effect on the endosomal membrane [34].

Polycationic lipids are numerous and extremely varied. As for monocationic lipids, current research strives to improve their efficiency. As an example, some elements may be added to the formulation, such as neutral lipids or fusogenic agents that influence the stability of the complex in the cell, or ligands for targeting.

2.1.3 The development of lipids derived from cholesterol for use in gene delivery systems

The idea of using cholesterol as a hydrophobic anchor is based on the compatibility of this compound for biological membranes, as cholesterol is a naturally occurring membrane component. The first cationic lipid cholesterol derivative was DC-Chol (3[*N,N'*-dimethylaminoethane]-carbamoyl cholesterol), synthesized by Huang et al. [35]. Used in combination with DOPE, this compound has been demonstrated to transfect the nasal epithelium of CF patients [36]. Moreover, this trial established the proof-of-principle that this compound could be effectively readministered in human airways. Following this result a multitude of cationic cholesterol derivatives were produced. Notable among them are GL67 (N4-spermine cholesterylcarbamate, Genzyme Corporation) and BGTC (bis(guanidinium)-tris(2-aminoethyl)amine-cholesterol) [37].

The GL67A formulation, associated with DOPE and a steric stabilizer (DMPE-PEG₅₀₀₀) is used for running aero-

solization multidose clinical assays for CF in United Kingdom [38] (<http://www.cfgenetherapy.org.uk>). In numerous preclinical studies, GL67A was delivered by nasal instillation, and transgene expression was mainly localized in type I pneumocytes [39]. Administered in the same way, naked pDNA and pDNA-PEI resulted in the expression of the transgene in ciliated and Clara cells of the conducting airway [39]. BGTC is efficient for gene delivery into primary cells for human lung epithelium and mice airway cells after intratracheal administration of lipoplexes [40]. DOTAP-DOPC/DNA and DC-Chol-DOPE/DNA formulations were taken up by Chinese hamster ovary cells (CHO) through macropinocytosis. DC-cholesterol-DOPE/DNA was able to escape effectively from endosomes, unlike DOTAP-DOPC/DNA which was degraded in lysosomes [41]. Macropinocytosis is a cholesterol dependent internalization process, and can explain the efficient escape from endosomes of DC-Chol-DOPE/DNA lipoplexes [41].

In order to develop more effective synthetic delivery systems, original multimodular systems (MMS) based on DOSP or BGTC have been synthesized and assessed in cell lines and animal models [42]. When, two intravenous administrations were performed, DOSP complexes showed identical best and prolonged biodistribution in the bloodstream with no significant cytotoxicity after the second injection. PEG DNA LNCs (Lipid NanoCapsules) showed a rapid clearance, probably due to rapid blood clearance after the second administration. This difference observed in terms of bloodstream circulation and distribution profiles can be explained by the lipid and surface composition of the molecules tested [42]. Considering the intracellular pathways followed by the two cationic lipids, BGTC and DOSP identify two distinct escape mechanisms from endosomes. Partial or total disassociation of lipoplexes was observed prior to endosomal escape with BGTC, whereas complexes based on DOSP were still detectable in the disrupted compartments, which may explain their different transfection efficiencies [43]. In addition, assemblies of unusual multilamellar lipidic structures were observed, probably as a result of close exchange between internalized lipid complexes and membrane compounds during the dissociation of the complexes. This class of vector continues to be explored in order to improve its transfection efficiency.

2.2 The development of cationic polymers for use in gene delivery

Cationic polymers represent a subset of synthetic condensing NA carriers consisting of synthetic polypeptides, PEI, cationic dendrimers, and chitosan [44]. The simplicity of these polyplexes is a major strength of polymeric vectors. PEI and poly-L-lysine (PLL) are two important formulations that have been extensively studied for use as synthetic vectors. Indeed, PLL was originally the most

commonly used cationic polymer. Since then, it has been shown that dendrimers and PEI are able to condense NA and form high efficient polycomplexes for NA delivery, both in vitro and in vivo, after local or systemic administration [45].

2.2.1 The use of poly-L-lysine in gene delivery

PLL is a synthetic polypeptide vector with high biodegradability and biocompatibility [46], but its tendency to be retained in endosomes greatly impacts its transfection efficacy [47]. This attribute may be due to protonation of all the amine functions at physiological pH. Nevertheless, various modifications can circumvent the disadvantages of this polymer. The solubility can be increased by grafting PEG. PEG also helps with resistance to the immune specific or unspecific response by extending the half-life of the complex in the bloodstream. The addition of histidine residues to PLL results in a significant augmentation of the transfection levels (around three to 4.5 times) of PLL polyplexes, by promoting exiting from endosomes due to the proton sponge impact of the histidine residues [48]. Inspired by this polymer, many other peptidic structures have been used, such as poly-ornithine and poly-arginine resulting in an efficient molecule [48].

Hyperbranched PLL is an attractive synthetic vector that has been recently synthesized, and produced at a large scale. In addition, it is completely biodegradable, which can prevent toxicity [49]. Hyperbranched PLL was shown to have in vitro transfection abilities close to PEI [49]. Amino acids such as arginine or lysine, localized in the hydrophilic head group have an impact on the effectiveness of amino acid-based cationic complexes [50]. For example, in transplantable rat pheochromocytoma cells (PC-12), cationic liposomes containing arginine with HCl-salt present transfection levels around 4- to 4.5-fold higher than Lipofectamine. It has been shown that arginine-based compounds associated with trifluoroacetic acid (TFA) salt have better gene transfer capacity in HeLa cell lines, 1.5- to 1.8-fold higher than Lipofectamine [50]. In the absence of serum, these formulations present a very low cytotoxicity in HeLa and PC-12 cells; with more than 50% viable cells after the deposit of 200 µg/mL of the corresponding polymers compared to the cells treated with Lipofectamine [50].

2.2.2 Polyethyleneimine as a gene delivery system

PEI is a polymeric compound mainly used in chromatography and the paper industry. It was used for the first time in 1995 for gene transfer by Prof J. -P. Behr and his team [45]. PEI is a very commonly used synthetic vector due to its high level of transfection. However, its density of charge, its nondegradability, and cellular toxicity restricts its applications [47, 51]. Although PEI polyplexes present a large cationic charge at their surface and display a very significant transfection ability, PEI triggers extremely

severe cytotoxicity because of its agglutination with erythrocytes [52]. However, the addition of γ -PGA (gamma-polyglutamic acid) induces a significant increase in the transfection of B16-F10 cells, despite its negative charge.

It has been reported that PEI polyplexes were endocytosed into cells due to the interaction with heparan sulfate located in the membrane [53], whereas the pDNA/PEI/ γ -PGA complex enters the cells via γ -PGA-specific receptor mediated pinocytosis. Indeed, PEI transfection efficiency depends on many parameters, principally on PEI shape and its molecular weight (MW). Thus, 25 kDa hyper-branched PEI (PEI25kDa) constitutes a standard synthetic gene delivery system. As described previously, the "proton sponge" escape capacity is a valuable tool for escape from endosomes resulting in the release of numerous copies of a transgene into the cytoplasm, a phenomenon used to explain the high transfection capacity of PEI [47]. For example, PEI25kDa showed promising gene transfer efficiency after its aerosolization in the respiratory tract of mice. Significant differences between mice receiving single aerosol dose and those receiving multiple doses were observed. In fact, at 24 h whole lung luciferase activity after single aerosol exposure was 68 ± 9 RLU/mg compared with 49 ± 4 RLU/mg for the second aerosol dose. Significant reduction in luciferase activity was found following third (15 ± 2 RLU/mg) and fourth (13 ± 2 RLU/mg) doses compared to the single aerosol dose [54]. This reduction in luciferase activity was correlated to the molecular weight of the PEI used [54]. Low MW PEI does not induce inhibition of luciferase expression compared to PEI polymers with a high MW which can be explained by the cytotoxicity associated with high MW PEI [54]. Significant gene expression in lungs was detected in rodents [55] and in sheep [56], specifically in ciliated epithelial cells of the whole murine respiratory system [39], and alveolar type I pneumocytes [39, 57]. In parallel, the 22 kDa linear PEI used for systemic administration can effectively transfect several organs in neonatal mice [58].

To decrease its toxicity and to avoid enzyme degradation, PEI has been significantly modified by, for example, the introduction of PEG and these derivatives evaluated in many assays [59]. Along similar lines, betaine monomers (*N,N*-dimethyl(acrylamidopropyl) ammonium propane sulfonate, DMAAPS) have recently been grafted to PEI25kDa, leading to polyplexes with lower protein adsorption, slightly toxicity and significant gene transfer capacity [60]. In in vitro transfection assays, PEI-DMAAPS gave up to 56% positive cells whereas PEI25kDa led to 21% [60]. Another trial was based on the addition of motifs allowing cell targeting in order to prevent complexes from remaining in the bloodstream. Some interesting in vitro and in vivo results were reported, using PEG-PEI copolymers functionalized with RGD peptide motifs (arginine-glycine-aspartic acid) that interact with integrin receptors present on the surface of the endothelium [61]. These

PEG-PEI copolymers could also present different sugar motifs in order to target some of the epithelial cells of the lung [61, 62]. Two studies suggested that the augmentation of gene transfer capacity can be explained by an optimal equilibrium between complex formation and buffering ability of the polymer [63]. PEI and PLL have complementary characteristics. In fact, after the introduction of PLL, some difficulties appeared but these could easily be resolved. For example, PEI-PLL transfection efficiency was almost seven times more efficient than PEI25kDa [47]. Additionally, using a xenograft tumor model, this formulation led to a better inhibition of tumor growth than PEI25kDa [47].

When the endocytosis of polyplexes is routing to acidic vesicles (clathrin and caveoline dependent pathways), NA can be delivered to the cytosol by exploiting the proton sponge effect induced by PEI. Even if PEI is the polymer exhibiting the highest level of protonated amines per unit, this effect can be increased by the substitution of a certain percentage of these secondary amines with imidazole function. Indeed, as the pKa of the imidazole groups are less acidic than that of the secondary amines, the proton sponge effect is expected to occur at a less acidic pH. Thus, endosomal escape can be induced in early endosomes at pH 6.0–6.5. For this purpose, linear PEI has been partially grafted with histidine residues (His-PEI) [64]. A grafting ratio of 16% of *N*-acryloyl-L-histidine on IPEI corresponds to an optimal balance between transfection efficacy and cytotoxicity in comparison with IPEI. Moreover, replacement of some of the amino groups of PEI generally reduces toxic side effects of the corresponding polyplexes [65, 66].

2.3 Development of cyclodextrins for use in gene delivery systems

Delivery systems based on cyclodextrins have also been developed [67]. Cyclodextrins, natural biocompatible cyclic oligosaccharides containing six, seven, or eight D(+)-glucose units linked together through α -1,4- bonds and called α -, β -, or γ -cyclodextrin, may be converted into a cationic entity per substitution with small cationic compounds. They form complexes with plasmid DNA also called CDplexes. α - and β -cyclodextrins were replaced with oligoethylenimine blocks (from 1 to 14) [68]. Cationic polymer derivatives of cyclodextrin have also been synthesized. Davis et al. synthesized an α -cationic cyclodextrin polymer by copolymerization of 6A, 6D-dideoxy-6A, 6D-di(2-aminoethanethio)- β -cyclodextrin [69]. This type of compound was used for DNA and siRNA transfection, as well as for the targeting and imaging of tumors after IV [70]. The capacity to include hydrophobic molecules, such as adamantane, in the hydrophobic cavity of cyclodextrin can be exploited to decorate CDplexes with adamantyl derivatives in order to: (i) generate stealth when used in conjunction with adamantyl-PEG; or (ii) cell

specificity when used with adamantyl-ligands. Clinical cancer treatment trials have been performed with the cyclodextrin cationic polymer RONDEL on which adamantyl-PEG molecules were fixed. Adamantyl-PEG-transferrin has been successfully used for delivery of siRNA [71]. Cationic cyclodextrins were also combined with positively charged polyrotaxanes either with a poly(ethyleneoxide)-poly(propyleneoxide) poly(ethyleneoxide)(PEO)-P(PO)-P(EO)) triblock copolymer, a PEI-b-PEG-b-PEI copolymer, or α,ω -dimethacrylate poly(ethylene glycol) [68]. β -Cyclodextrin can be used as a frame to generate homogeneous sevenfold symmetric polyaminothiourea amphiphiles for NA carriers [72]. This structure provided a useful platform to synthesize glycodendrimer derivatives by the attachment of sugar ligands able to recognize cell surface sugar receptors for targeting purpose [73].

2.4 Use of alkylated cationic polymers and micelles in gene transfer

Cationic polymers can be substituted with hydrophobic molecules which favor polyplex passage through biological membranes. These cationic polymers form micelles when interacting with NA constructs and enable mammalian cell transfection. An example is the substitution of small molecular weight (2k Da) PEI with cholesterol [74] or dexamethasone [75]. Fatty acids including caprylic, myristic, palmitic, and stearic acid were also grafted onto PLL or PEI [76, 77]. Protamine and chitosan have also been substituted with stearic acid [78, 79]. Compared to PEI and lipofectamine, palmitic PLL gave the highest number of EGFP transfected cells. Stearyl PEI was found to efficiently suppress tumor development (>60%) by facilitating the transfection of a plasmid encoding a pigment epithelium-derived factor. The effect of this transgene was partially attributed to the proton-buffering capacity of PEI. Stearic chitosan was also grafted to a small MW PEI (800 Da) to confer proton-buffering ability and increase transfection capacity [80].

2.5 Use of block copolymers in NA delivery

Block copolymers such as poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine) (PEG-b-PLL), poly(ethylene glycol)-block-poly(ethylenimine) (PEG-b-PEI) and poly(ethylene glycol)-block-poly(di-methylaminoethyl methacrylate) (PEG-b-PAMA) are organized with a cationic domain and a hydrophilic domain together forming cationic micelles [81]. They complex with NA and are able to deliver transgenes into mammalian cells. Polyplex micelles based on the PEG-PLL block copolymer (PEG-PLL) show significant stability in the presence of serum and persist for a long time circulating with undegraded NA in the bloodstream. However, it is the absence of an endosomal escape capacity that enables the transfection activity. In

Table 1. Principal synthetic vectors used in gene transfer

Synthetic vectors	Chemical nomenclature	Advantages/ Disadvantages	References
DOTMA	<i>N</i> -[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -trimethylammonium chloride	Toxic Efficient gene delivery	[17]
DOTAP	<i>N</i> -[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -trimethylammonium methyl sulfate	Biodegradable Less toxic	[18, 19]
DORIE	Bromide of dimyristyloxypropyl-dimethyl hydroxyethylammonium	two- to three-fold higher transfection efficiency compared to DOTAP – in vitro transfection assays	[19]
DMRIE	Dimyristyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethylammonium	DMRIE transfection activity was two times greater than the DORIE	[19]
KLN47	Dioleoyl phosphoramidate-arsonium	Effective in different cell lines and in mouse lungs after intravenous injection	[11, 23, 24]
BSV4	Dilinoeoyl phosphoramidate-arsonium	More effective to transfect murine lung tissues after intravenous administration High toxicity	[24]
BSV18	Diphytanyl phosphoramidate-arsonium	More fusogenic inversed hexagonal phases Effective in vivo Difficult to synthesize	[25]
DOGS	Diocetadecylamine-glycine-spermine	High transfection efficiencies in eukaryotic cells due to fusogenic properties	[29]
DOST	Dioleoyl succinyl tobramycin	Destabilizing effect on the endosomal membrane	[34]
DOSK	Dioleoyl succinyl kanamycin A	Able to form small particles when complexed with siRNA molecules	
DOSN	Dioleoyl succinyl ethylthioneomycin B	Highly efficient for in vitro delivery of siRNA	
DOSP	Dioleoyl succinyl paromomycin		
DC-Chol	3 [N-(<i>N,N'</i> -dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol	Efficient DNA transfer in cell lines Less toxic Easy to synthesize and stable for at least six weeks Able to transfect the nasal epithelium of CF patients	[35, 36]
GL67	N4-spermine cholesterylcarbamate	Transgene expression mainly localized in type I pneumocytes after nasal instillation	[38, 39]
BGTC	Bis guanidinium-tren-cholesterol	Efficient gene delivery into primary cells of human lung epithelium, and mice airway cells, after intratracheal administration and aerosolization	[37, 40]
PLL	Poly-L-lysine	High biodegradability and biocompatibility Low endosomal escape ability The addition of histidine residues to PLL, results in a significant augmentation of the transfection efficiency of PLL polyplexes	[48]
PEI	Polyethyleneimine	High transfection efficiency Cytotoxic Not biodegradable	[45, 47]

comparison, the presence of a poly[*N*-[*N*-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide] side chain linked to a PEG–PLL block copolymer conferred the proton sponge feature observed by the gradual decrease in cellular pH [82]. These polyplex micelles provided a high transfection

efficiency with low toxicity in different cellular conditions, including primary cell culture. Indeed, compared to the diblock systems, triblock systems led to a gain of a log in term of transfection [82, 83]. They also allowed efficient gene delivery to pancreatic tumors in vivo after systemic

administration demonstrated by significant EGFP expression [83]. The fusogenic lipid DOPE was grafted onto a PEG-PLL copolymer to promote endosomal escape of pDNA [84]. Inclusion of poly-L-histidine resulted in an increase in buffering capacity of a triblock copolymer (PEG-CH₂K₁₈), which was comparable to that of branched PEI [85]. Evaluation assays showed that, in vitro gene delivery with PEG-CH₂K₁₈ was improved by ~20-fold over PEG-CK(30) complexes, while pDNA delivery to mouse lungs was multiplied around three times, and few clinical side effects were observed [85].

2.6 Use of lipopolyplexes for transfection

Designed by Huang and co-workers, lipid-polymer-NA complexes (named LPD or lipopolyplexes) are nonviral carriers for various NA constructs (pDNA, antisense oligonucleotides, mRNA and siRNA) [86, 87]. LPDs are formed by combining cationic liposomes with preformed polyplexes. Upon mixing, component rearrangement leads to condensed NA inside the lipid membrane. Lipopolyplexes made with DOTAP associated with cholesterol liposomes and protamine sulfate, or DOPE cholesterol hemisuccinate liposomes associated with PLL have been devised. In literature, polyplexes made with PLL or protamine were combined with various types of liposomes comprising cationic and neutral lipids including DOTAP, DC-Chol, arginylated-cholesterol, lysinylated-cholesterol, DOTMA [88], DOCSPER (3-dioleoyloxy-2-(*N*-carbamoylspermyl)propane), PC [89], DSAA (*N,N*-di-*N*-methyl-*N*-methyl-*N*-2-(*N*-arginyl) aminoethyl ammonium chloride) [90], cholesterol, DOPE, DPPG (Dipalmitoyl-phosphatidyl-glycerol), and DPPC [91]. The Tat peptide sequence is the nuclear localization signal of the HIV-1 Tat protein, and has been used to form LPD with DOSPA/DOPE liposomes [92]. LPD were formed with PEGylated histidylated polylysine (PEG-HpK) polyplexes and L-histidine-(*N,N*-di-*n*-hexadecylamine) ethylamide (HDHE) cholesterol liposomes as well as with *N*-methyl imidazolium lipophosphoramidate:histamine lipophosphoramidate (Lip 100) liposomes [93–95]. The imidazole moiety of the histamine lipophosphoramidate and histidylated polylysine acquires a cationic charge at pH < 6.0 and can induce an acid-mediated membrane destabilization of endosomes. These LPDs have been used for mRNA vaccination.

To favor targeting of dendritic cells, mannosylated liposomes were used to prepare mannose-LPD containing mRNA [94]. For example, tumor cell targeting with LPD has been obtained with PEGylated LPD formulations. These formulations are prepared by post-insertion of DSPE-PEG into the preformed LPD, hiding the positive charge, rendering them neutral, and limiting interactions with the protein in serum. Moreover, a cell-specificity can be generated by post-insertion of DSPE-PEG bearing a small recognition molecule [96]. For instance, post-inser-

tion of DSPE-PEG-anisamide facilitated association with the sigma receptor overexpressed in human cancerous lung cells. Otherwise, these PEGylated formulations (~100 nm) were found to accumulate in vascularized tumors through the enhanced permeability and retention (EPR) effect and subsequent internalization was mediated by the sigma receptor of the tumor cells [97]. Table 1 summarizes some of the principal synthetic vectors developed for gene delivery over the years by different teams.

3 Cellular barriers to targeted gene delivery

3.1 Overcoming intracellular barriers

Crossing the plasma membrane of targeted cells is considered as a key step in the nonviral transfection process. Once associated with the cationic vector, NA constructs must translocate to the nucleus and reach the transcriptional cellular machinery in order for the transgene to be expressed. Moreover for permanent expression, the transgene should be inserted into the genome. Most of these steps are described in Fig. 1. The role of cationic liposomes or cationic polymers is to compact and protect pDNA against nuclease degradation, to facilitate internalization, and, in the case of some vectors, to enable their escape from endosomes. In nonspecialized cells, cellular uptake studies of synthetic formulations indicate that pinocytosis occurs efficiently either by the clathrin and/or caveolae-dependent pathways depending on the cell type and the synthetic vector involved [98–100]. When endocytosis of polyplexes was mediated by clathrin-dependent endocytosis, pDNA can escape the endosomal compartment and reach the cytosol by exploiting the protonation capacity of the polymers. In addition to the role played by their cationic groups in condensing pDNA, the polyplexes also carried acid-protonable groups such as secondary amines [101, 102] or imidazole rings [103]. It is of note that when they route via the caveolea-dependent pathway, polyplexes can also reach the clathrin-dependent pathway [104].

As mentioned above, helper or co-lipids have often been formulated with cationic liposomes to enhance the fusogenicity of the complexes. Indeed, DOPE tends to constitute an H_{II} hexagonal phase arrangement in acidic medium, a structural organization that promotes the merging of lipid structures [105]. The presence of a single unsaturation in the acyl chain of DOPE was found to be a crucial factor for the fusion of the complexes with membranes [106]. In particular, the addition of colipids containing imidazole polar heads was found to contribute to the endosomal release of pDNA after their protonation [48].

To favor the nuclear delivery of pDNA, specific DNA sequences recognized by some transcription factors such

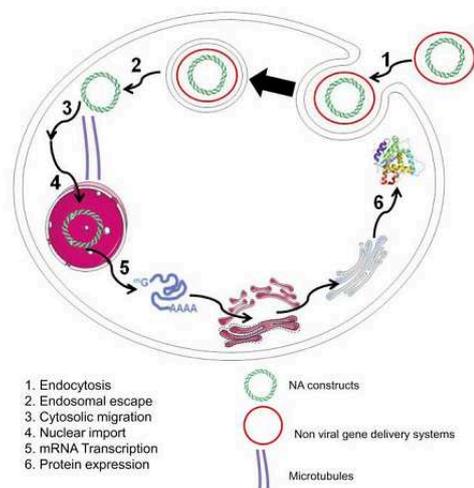


Figure 1. Intracellular multisteps procedure for non viral gene delivery systems. To reach the nucleus, NA constructs have to overshoot several intracellular barriers: (1) the plasma membrane by endocytosis, (2) the endosomal compartment, (3) cytosolic migration and finally (4) the nuclear envelope in order to be expressed and induced a therapeutic effect (5 and 6). Cellular uptake can occur in non specific endocytosis or by specific mechanism via mediated receptor. Once in the cytosol, NA decomplexed from synthetic carriers have to migrate to the nucleus, and penetrate, when the nuclear membrane disappears during mitosis or have be transported actively through the nuclear pores.

as NF κ B were inserted into the pDNA [107, 108]. Nuclear entry of NA via the nuclear pore is an active process and is probably size dependent. In the same way, cytoplasmic fate of NA depends also on its size. Indeed, it had been shown that plasmids greater than 2 kb were unable to pass into the cytosol [109]. Hence, it is attractive to suggest that increasing the number of plasmid copies close to the nucleus enhances the transfection efficiency.

Targeted migration of pDNA along microtubules toward the nucleus after endosome escape has recently been achieved. Strategies that used dynein light chain associated sequences (DLC8-AS) peptides of LC8 resulted in humble improvements in transfection efficacy [110, 111]. Midoux and coworkers discovered that when peptide P79-98 from the 14.7K E3 protein of human adenovirus is grafted onto the plasmid, it mediates interaction of pDNA with microtubules in cell lines, and considerably enhances polyplex transfection [112].

The safe integration of a transgene into a cell was the final challenging step for gene therapy. Transposon-based systems including Piggyback, Sleeping Beauty and Minos transposons are promising tools for the integration of a gene of interest into the genome [113–116]. Transpo-

son systems direct the precise transfer of specific parts of a donor pDNA into a mammalian chromosome. The excision of the transposon from donor pDNA and its insertion into a chromosomal site is mediated by a transposase. To prevent long term expression of the transposase or its insertion into the genome, it is preferable to deliver transposase mRNA instead of having it encoded in the pDNA [117]. This strategy requires a co-delivery of pDNA encoding the therapeutic gene and the transposase mRNA. The *Minos*-based transposon system has been shown to be active in various organisms, with, for example, efficient transposase insertion of one or multiple copies into the germ line of *Bactrocera oleae* [116]. This system is also active in mammalian tissues [118]. *Minos*-based transposase technology has proven effective for performing tagged mutagenesis during early mice spermatogenesis [119].

Other promising systems to correct errors in the genome are emerging, such as clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein (CRISPR/Cas) system. CRISPR/Cas system is an adaptive immune system found in bacteria and archaea that confers resistance against invading genetic elements such as plasmids and phages. This emerging technology can be applied to repair disease-related mutations such as CF. Indeed, correction of the CFTR locus by homologous recombination in cultured intestinal stem cells of CF patients using CRISPR/Cas9 has been successfully performed, resulting in functional expression of the corrected allele [120]. This technique was also effectively applied to mouse eggs to correct a dominant mutation in the *Crygc* gene known to cause cataracts [121].

The intracellular trafficking of NA formulated as lipoplexes, polyplexes or lipopolyplexes is not yet completely understood in nondividing cells. In particular the question remains as to whether pDNA is delivered into the nucleus as free pDNA or it is still complexed with liposomes or polymers or associated with intracellular biomolecules. It is known that cytosolic migration and nuclear delivery are highly dependent on the availability of pDNA in the cytosol. The cytosolic availability of pDNA is dependent on the efficiency of endosome escape and probably also on the dissociation of pDNA from NA-complexes. Several lines of evidence indicate that transfection efficiency may depend on the complete or partial dissociation of polyplexes or lipoplexes. For instance, reducible polymers that allow polyplex dissociation after reduction in the cytosol were reported to enhance gene delivery effectiveness [122, 123]. Reduction in the number of positive charges of PLL was reported to favor polyplex dissociation and expression of the reporter gene [124]. Indeed, it has been proposed that in nondividing cells, transfection efficiency of polyplexes is dependent on the fate of NA in the cytoplasm, meaning that endosomal process and/or polyplexes separation is believed to be essential for entry into the nucleus [125].

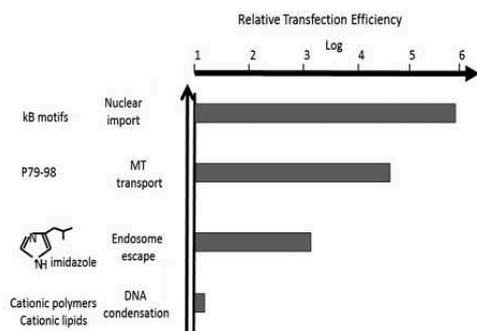


Figure 2. The evolution of nonviral gene delivery systems showing strategies that have improved their efficiency. Vectorization has evolved considerably within a few years. The main points are that: NA were initially used alone; subsequently they were incorporated into various systems such as recombinant virus and synthetic carriers. A variety of compounds with different properties (e.g. PEG, DOPE, and imidazole motifs) have been added to the formulations for reasons including: (i) assisting the NA in escaping the immune system; (ii) promoting endosomal escape and enhancing furtivity; and finally (iii) to increase the efficacy of the lipoplexes. Ligands for cell targeting were also added to the complexes to increase their specificity. To promote nuclear delivery of pDNA, specific DNA sequences recognized by some transcription factors, such as NFκB, were inserted into pDNA. When a sequence encoding peptide P79-98 of the 14.7K E3 protein of human adenoviruses, is contained in the plasmid it mediates interaction of pDNA with microtubules in cell lines, and considerably enhances polyplex transfection. Other strategies are currently under study.

All strategies mentioned in this section are presented in Fig. 2 and demonstrate how the efficiency of NA delivery has increased through adaptation of synthetic formulations and functionalization of the transgene. By answering these important questions new strategies will emerge for the assembly of different signals allowing efficient nuclear delivery of the transgene. However, these assemblies will remain dependent on the capacity of lipoplexes, polyplexes or lipopolyplexes to overcome intracellular barriers.

3.2 Extracellular barriers encountered in gene delivery vary depending on the pathway of administration

The complexity of in vivo gene transfer, in term of accessibility, varies depending on the cell to be targeted and how the drug is administered. Several anatomical and extracellular barriers limit delivery and expression of the transgene at a specific location. Among anatomical and cytological barriers, epithelial and endothelial cells as well as the extracellular matrix prevent the direct entrance of exogenous molecules into most target cells. Extracellular barriers include phagocytosis by specialized cells, such as Kupffer's cells in the liver or macrophages in the spleen

contributing to the clearance of the administered nanovectors via the systemic pathway [12]. In cancer treatment, unique features of the tumor microenvironment profoundly impact efficacy of cancer therapies. The properties of the cancer extracellular medium, including increased interstitial pressure, decreased pH (6.5–6.8), hypoxia and abnormal vascularity result in limited drug delivery and efficacy [126]. Depending on the mode of administration, different parameters restrict extracellular trafficking of the NA complex into the target cells. Therefore, local delivery (via airways for example), seems more appropriate and safe, but has its own constraints (such as limited volume, and maintaining the integrity of the respiratory function). Indeed, lung tissue has the advantage of being accessible by both intravenous and local routes. However, the difficulty in crossing the vascular endothelium remains a major obstacle for intravenous administration and increases the risk of embolism. Local administration is therefore preferred to the systemic route, because it circumvents endothelial barriers and increases the concentration of nanovectors in the pulmonary tract while reducing adverse systemic effects [127]. To obtain the greatest therapeutic effect, an appreciation of the extra- and intracellular barriers and how the chemical design of carriers could be adapted is required. In Section 4 we mainly focus on two routes of administration, systemic and local, to highlight the cellular barriers associated with each pathway.

4 Routes of administration for gene therapies

4.1 The intravenous pathway

IV injection allows access to the entire endothelial system as well as vascularized organs. It also permits targeting of both primary tumors and metastases. Complexes administered by a systemic route have to circulate in the blood stream for long enough to reach their targets. In this route there are multiple risks of elimination [128], mainly related to NA complex instability, aggregation, and capture by cells capable of phagocytosis. Phagocytosis of NA complexes is often accompanied by an inflammatory response [129]. Regardless of the location of venous injection, a large proportion of the molecules injected are trapped by the liver [130]. Injected complexes are quickly transported to the heart via the venous network. After the passage through the heart, they pass through the pulmonary microcirculation before being distributed throughout the rest of the body [130]. Given that the pulmonary network consists of the smallest capillaries of the human body, only very small particles are able to pass through these capillaries, larger particles are blocked engendering a risk of pulmonary embolism [131]. This particular feature of the pulmonary network may explain the high pulmonary expression of transgenes following IV injection.

Retention of particles in the lung is increased by serum aggregation of lipoplexes [132]. Following disruption of the endothelium and the basal membrane after injection, cationic formulations can interact with the surface molecules of pulmonary cells, such as proteoglycans and anionic proteins [133], enabling their endocytosis [134]. The fate of injected complexes is dependent on the interactions that occur with elements in the blood. Once in the bloodstream, complexes can interact with opsonins through hydrophobic interactions [131, 135], and with anionic proteins like albumin, lipoproteins, and heparin [136], thus modifying the size and charge of the complexes [137]. This may facilitate complex removal by the phagocyte system [138]. Adjustments to particle size avoid the opsonization phenomenon that leads to complex entrapment by the reticulo-endothelial system. Bypassing this obstacle allows an increase in the *in vivo* flow of the particles [16].

Electrostatic interactions may induce a disorganization of the complexes, a release of NA and its degradation in the bloodstream. Dose-dependent hematological and serological toxicity (leucopenia, thrombocytopenia and serum transaminase elevation) were reported for mice after systemic administration of different cationic lipid/NA complexes (GL67, DMRIE, DOTMA/DOPE) [139]. The currently available IV gene administration routes do not guarantee effective transfer of therapeutic transgenes to target cells, or long-term and stable protein production [140]. Evaluation of liver damage induced by the IV injection of different molecules reported a transient hepatocytolysis in mice [25].

In summary, intravenous administration is interesting for testing and evaluating new formulations, because respiratory epithelial cells are easily accessible. In addition to liver damage, IV routes of administration may lead to pulmonary embolism if aggregates are formed, and thus, can not easily be transferred to the clinic. Therefore, the approach of local delivery (via the airways), seems a more suitable route of administration, but this route has its own constraints. Indeed, the therapeutic gene must be administered directly into the airways by instillation or aerosol, and due to the permanent renewal of the respiratory epithelium, administrations must be repeated over time, unless the NA complex can transfect stem cells of the respiratory epithelium.

4.2 Local pathways for gene therapy administration

The clinical achievement of gene therapy will result from the use of efficient and finely tuned synthetic gene delivery systems and their adaptation to the most suitable administration pathway. When considering lung diseases, the pulmonary delivery route is postulated to be the most appropriate way to correct epithelial cells, such as in the case of CF, or to inhibit tumor growth in the case of lung cancer [141]. Inhalation techniques have shown

promise as methods of gene administration into the lungs. It is common knowledge that aerosolization of many drugs is extensively employed in the medication of respiratory diseases and therefore this route is described as an effective, noninvasive and safe therapeutic approach [140]. Today, inhalation delivery of chemotherapy represents an important targeted approach for lung cancers and metastasis treatments. Recently, patients with osteosarcoma presenting lung metastases have been successfully treated using inhaled lipid cisplatin (ILC) [142]. Inhalation therapy has benefits for treatment of lung diseases. Indeed, direct delivery of the drug avoids first-pass liver metabolism, enabling effective administration and larger distribution of the active molecule into the lung, while limiting anatomical filters [142]. Intranasal deposition of complexes also allows a quick assessment of the *in vivo* efficiency of a nonviral formulation, in a noninvasive manner, as nasal epithelium responds similarly to lung epithelium. Unfortunately, this method does not allow transfection of the bronchia and lungs and shows limitations when applied in CF mouse models.

To be effective, an inhaled agent should reach the lung in sufficient concentration, with the induction of minimal pulmonary toxicity and limited systemic absorption inducing systemic side effects [142]. Nevertheless, this pathway shows some disadvantages. The airway epithelium contains a multitude of strong barriers preventing the penetration of pathogens as well as gene transfer into cells and/or in the interstitial compartment. Moreover, particles must be sufficiently small to be able to enter the bronchi and bronchioles. In addition, once the administered molecules have reached the airways, they may become trapped in mucus and eliminated by the mucociliary defense mechanism [140]. Glycocalyx and cilia represent another major obstacle, preventing the interaction of the carrier with the cellular membrane, thereby reducing cellular internalization of the complexes. Tight junctions between epithelial cells also constitute a barrier for gene delivery.

This situation is worse in CF patients. Excess mucus, purulent secretions, bacterial and fungal infections, and chronic inflammation further complicate the situation affecting the integrity of the vector and its access to cell membranes. It has been shown that sputum and bronchoalveolar lavage fluids (BALF) collected from CF patients limits the transfection efficacy of the lipoplexes [143]. In the context of CF, intravenous and intratracheal administration, which consists of a direct deposit of complexes into the trachea, remain a relevant way to test original formulations, but these methods are not easily transferrable to the clinic.

Local lung delivery through inhalation allows specific transfection of the respiratory epithelium with reduced side-effects. Moreover, compared to viral vectors, synthetic gene delivery appears to be efficient without requiring bronchoscopic delivery. Thus, noninvasive pul-

monary administration of formulations carrying therapeutic transgenes or conventional medications seems highly promising, but remains difficult to develop compared to administration by the intravenous route. To overcome all obstacles mentioned previously, progress is needed. Recently extensive studies have been conducted on the aerosolisation of complexes in order to circumvent these difficulties [54, 56]. Nonviral gene delivery was assessed in large animals using pDNA complexed with either 25 kDa-branched PEI, cationic liposome (GL67A) or polyethylene glycol-substituted lysine 30-mer. Complexes made with pDNA encoding CFTR gene were delivered to sheep lungs by aerosol [56, 144]. GL67A provided the higher level of transgene expression in small airway epithelial cells. Due to its efficacy and stability following aerosolization, GL67A was considered to be the most relevant vector following aerosol administration to sheep lungs. It is currently being tested in a multicentric multi-dose clinical trial including a large number of CF patients [56, 144].

4.3 Gene therapy administered via hydrodynamic limb vein injection

Hydrodynamic injection via the saphenous vein (HLV) of the limb is a locoregional gene transfer administration method, consisting of an intravenous injection of plasmid into the posterior paws of mice after applying a tourniquet [145]. Thus, the solution containing NA is rapidly injected under pressure inducing vessel permeation and allowing massive delivery of NA into the neighboring skeletal muscles. This method of administration has proved to be safe [145, 146] and repeated injections can be performed without major damage. HLV has been used to deliver pDNA encoding dystrophin in dystrophic (mdx) mice, resulting in improvement in muscle function [147]. This administration route has also been applied to dogs [148], nonhuman primates [149], and people with muscular dystrophy [150]. Unfortunately, HLV of lipoplexes and polyplexes is less efficient than naked pDNA (unpublished data). One paper reported similar transgene expression in skeletal muscle of mice receiving either naked pDNA encoding luciferase or polyplex nanomicelles of PEG-PLL block copolymer containing 16 units of lysine and 12 units of ethylene glycol [151]. For this specific method of administration, new formulations are required to improve on the results obtained with naked pDNA.

5 Biodistribution and elimination of synthetic vectors

With the aim of fine tuning the design and adaptation of therapeutic nanoparticles, data regarding their pharmacokinetics and biodistribution should be assessed when

new vectors are transferred from in vitro assays to first preclinical trials. Molecular imaging provides many features enabling means of safe assessment such as bioluminescence, biofluorescence and scintigraphy [152], and also allows histological analysis after the euthanasia of animals. Knowledge and understanding of the mecha-

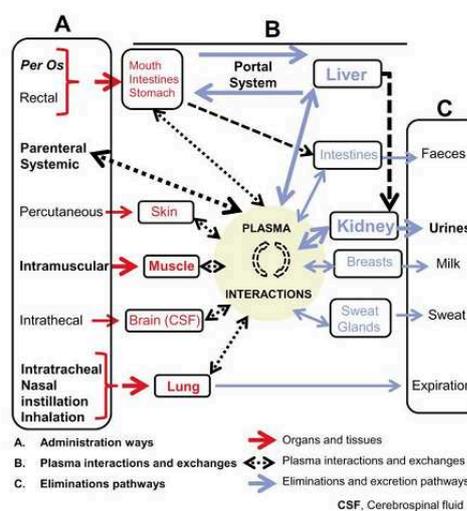


Figure 3. Administration and elimination pathways. This figure summarizes the principle administration and elimination pathways. (A) represents the different administration routes, and the most common are indicated in bold type. Principally, three main administration routes are used for drug delivery: (i) systemic injection; (ii) inhalation; and (iii) *per os* administration, allowing a quick plasma diffusion. However, for gene delivery, *per os* is not required because a large amount of molecules are eliminated due to the first-pass liver metabolism. Then, as for any drug, the development of non viral gene delivery systems requires to adapt their formulations to the route of administration in order to optimize drug delivery and overcome the biological barriers related to the selected route of administration. Thus, it is necessary to establish their blood pharmacokinetics, tissue biodistribution profile, kinetics of extravasation into tissue, and kinetics of clearance. (B) illustrates the exchanges between plasma components and target organs. In fact, most of the administration routes lead to a large plasma diffusion. Indeed, depending on the administration route, the pathway followed by the administered molecules is different regardless of target tissue. The thickness of the arrows indicates the importance of the pathways. Depending on mode of administration, drug can pass through different organs (muscle, lung etc.) acting as filter before reaching the plasma where they will interact with plasma components before being redistributed to other organs. (C) summarizes the main forms of elimination. Depending on the elimination organs, there are several forms of clearance such as urines, sweat, milk, faeces etc. The most important are indicated in bold type. Finally, the design of non viral formulations has to take all these aspects into account to promote the highest efficacy and avoid accumulations that could be responsible of side-effects.

nisms of pharmacokinetic and biodistribution of any drug in the body is fundamental and the improvement of non-viral gene transfer systems is not exempt to this rule. Indeed, pharmacological and toxicological parameters are critical to the success of preclinical and clinical trials using nonviral vectors. Many routes of administration enable diffusion of molecules in the bloodstream (Fig. 3). Currently, the three main administration routes used for drug delivery are: intravenous; inhalation; and per os administration, allowing plasma diffusion. For gene delivery, per os administration is not used, due to first-pass metabolism by the liver resulting in a large waste of the active molecule. There is much interest in the optimization of drug delivery and crossing of biological barriers related to the selected route of administration, and several approaches have been developed.

Based on data from biodistribution studies, it has been reported that polyplexes containing PEG chains remain intact in the bloodstream for three days compared to unpegylated molecules, suggesting that hydrophilic chains may limit adsorption of the plasma proteins with the complexes while PEG conveys a stealth feature limiting their degradation [153]. The density of PEG present on the nanocomplexes, its structure and chain length, represent some important parameters that have a significant impact on nanoparticle surface properties through the prevention of phagocytosis [154]. It was shown that longer PEG chains (600–1980 Da) grafted onto the surface of lipid nanoemulsions provide better stealth properties [155]. In addition, it has been highlighted that engraftment of PEG significantly reduces protein adsorption onto nanovectors and their uptake by mononuclear phagocyte systems [154]. In summary, use of pegylated nanocarriers led to a prolonged biodisponibility of the complexes, enhancing therapeutic efficacy of the delivered active principle by an increase of their availability [154]. However, numerous publications have reported that PEG itself can be immunogenic, resulting in antibody production directed against PEG, increased blood clearance, and a decrease in the efficacy of PEG complexes [156].

Several organs, mainly the liver, spleen and kidneys, play a key role in the pharmacokinetic fate of NA complexes. Indeed, the mononuclear phagocyte system (MPS), mostly found in the liver, is a monocyte/macrophage enriched tissue that favors filtration, entrapment and elimination of some blood elements such as cell fragments, bacteria, agglomerates, and synthetic complexes. Kidneys also control the elimination of nonviral systems through renal clearance mechanism [157]. As mentioned above, in vivo biodistribution of synthetic formulations varies depending on many physicochemical factors. Biodistribution comparison of various lipid nanocapsules (LNC) was performed in nude mice bearing HEK293(β_2) tumor xenografts [158]. Results showed that the 25 nm LNC disappeared rapidly from the bloodstream 1.5 h after systemic administration because of a larger distribution

into the tissues and rapid clearance. It was found that 50 and 100 nm LNCs remained in circulation for around 4 h. No difference was found in biodistribution profiles at 24 h for all LNCs [158]. Thus, it is important to perform kinetic studies, because although short time lapse biodistribution profiles varied, they were found to be similar in the long term. Many tools exist for kinetic studies of distribution such as biofluorescence imaging (BFI).

An important clearance appeared when vectors were less than 25 nm in diameter, at approximately 1.5 h [129, 158]. For the largest delivery systems (50–250 nm), their degradation was limited by their size, increasing their half-life in the bloodstream [129, 155, 158]. Another study comparing the biodistribution of several NA nanocarriers composed of new multimodular systems (MMS) with different cationic compounds, such as dioleylaminesuccinylparomomycin (DNA MMS DOSP), or bis(guanidinium)-tren-cholesterol (DNA MMS BGTC), and/or DNA lipid nanocapsules (DNA LNCs), revealed various biodistribution profiles and circulation times according to the cationic carrier employed, and its composition and surface properties [42]. For example, after intravenous injection, the authors reported that DNA MMS BGTC was rapidly accumulated in the liver of healthy mice. DNA MMS DOSP had a lower concentration in the liver compared to DNA MMS BGTC. DNA MMS DOSP exhibited an extended blood circulation, highlighted by a significant and visible accumulation for up to 24 h following the first injection, with fluorescence intensities four to five times greater than DNA MMS GAL [42]. Grafting a galactosylated motif to the formulations leads to their concentration in the liver [42]. As seen previously, this phenomenon is due to the binding of a galactose motif to the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R), located on hepatocytes that interact with terminal GAL-bearing ASGP, and promotes specific internalization of GAL-containing systems [159, 160]. It was found that after systemic injection, photoluminescent graphene quantum dots (GQDs) mainly built up in liver, lung, spleen, kidney and tumor sites [161]. Biochemical analysis and histological assessment revealed no significant side effects, nor organ damage and/or lesions after 21 days of treatment [161].

For siRNA delivery in cancer treatment, a stable PEI nanoparticle containing glycol/chitosan (GC-PEI NPs) with a strong positively charged surface was designed [162]. A profile showing rapid cellular uptake within 1 h was observed with siRNA-GC-PEI-NPs, leading to specific mRNA breakdown, and resulting in inhibition of RFP gene expression in cell lines as well as with animal models. These results confirm a higher tumor targeting capacity of these nanoparticle systems [162].

The charge of formulations is an important factor that determines their pharmacokinetic pattern. In fact, as the proteins contained in the plasma are negatively charged, they can interact nonspecifically with cationic elements [3]. To illustrate the importance of the charge surface,

neutral and anionic nanoparticles, such as mesoporous nanoparticles designed by Tanaka and coworkers, lipoprotein formulations proposed by Shahzad and coworkers, (both with a global charge around -3 mV) and LNCs (charge around $+7$ mV) were tested [163–165]. A siRNA LNCs for systemic administration was obtained presenting a 65% siRNA encapsulation efficiency [163]. Tumors were found to capture high density lipoprotein (HDL) molecules through the scavenger receptor type B1 (SR-B1), with HDL being necessary for cellular proliferation. With this in mind, a new siRNA delivery system was designed and incorporated into reconstituted HDL particles (rHDL) [164]. Effective silencing of expression of two important proteins (signal transducer and activator of transcription 3 and focal adhesion kinase), implicated in cancer growth and metastasis, was observed in ovarian and colorectal cancer models. Indeed, regardless of the ovarian cancer models used, STAT 3 siRNA/rHDL or docetaxel monotherapy induced a reduction in tumor weight by 62% compared to controls. A greater reduction in tumor weight of 92% was obtained, when STAT3 siRNA/rHDL and docetaxel treatments were combined [164].

A novel RNAi delivery system containing mesoporous silicon particles (stage 1 microparticles, S1MP) charged with neutral DOPC based complexes and siRNA was developed [165]. This new formulation targets the EphA2 oncoprotein overexpressed in many tumors, such as epithelial carcinoma of the ovary. After intravenous injection of S1MP-EphA2-siRNA-DOPC, efficient silencing of the EphA2 gene was obtained in about three weeks in different ovarian cancer models, reducing angiogenesis and cell proliferation, with no major changes observed in terms of biochemical or hematological parameters [165]. Another study revealed that inhaled plasmid encoding the human p53 protein was found principally in the lungs, whereas systemic injection of human p53 protein led to concentration in the liver, spleen and bloodstream [166]. It should also be mentioned that aerosol administration allows a fairly even distribution of inhaled material throughout the airways. This enhances the clinical relevance of aerosol administration, as direct deposition of genetic material in a relatively small area of the respiratory epithelium has been shown to induce both short inflammatory response and clearance mechanisms [57].

All these results highlight that different biodistribution profiles depend on both the nature and formulation of nonviral delivery vectors adapted to the means of administration. Indeed, there exists a close relationship between routes of administration, biodistribution profiles, and routes of elimination requiring fine tuning of the synthetic vectors. As a consequence, biodistribution studies are important for optimization of the formulations for specific administration routes. Figure 3 illustrates various possibilities and the necessary and preliminary work required to define the optimal route to target specific cells

and various barriers facing nonviral vectors. Additionally, it is important to anticipate the possible routes for elimination, regardless of the route of administration, in order to limit toxic side-effects.

6 Concluding remarks

40 years ago, the use of NA as a therapeutic was proposed and the necessity for efficient and safe carriers identified. Slowly, the development of gene carriers has moved from fundamental research to technology warranting the filing of patents. In some specific cases such as Adrenoleukodystrophy or X-SCID NA therapeutics are emerging treatments. Since many diseases are not curable or treatable with conventional therapies, gene therapy represents an avenue of hope.

Despite success based on viral vectors, serious obstacles still prevent the introduction of NA constructs into cells or organs and prevent the widespread use of gene therapy as a therapeutic. Both virus and synthetic formulations have been evaluated for gene delivery and many clinical trials have been conducted. Synthetic complexes exhibit many advantages in comparison with recombinant viruses. However, they also show a lower capacity of transfection in comparison with recombinant viruses, even if some spectacular progresses have been made in this field. Thus, much of the research effort around synthetic carriers focuses on the development of original formulations to improve transfection efficiency, especially when they are at the stage of warranting testing in animals. To overcome this disadvantage, combined efforts that encompass the synthesis, formulation, comprehension of cellular mechanisms, and in vivo behavior of synthetic carriers are needed.

It is necessary to more precisely define, according to the administration pathway, the molecular mechanisms underlying the biological barriers faced by synthetic vectors in order to fine tune their chemical structure and successfully overcome these obstacles. Although investigations regarding the effect of altering a chemical constituent of any compound are necessary, the definition of NA complexes characteristics as global complexes is also crucial because it impacts transfection capacity. These properties cover not only the nature and number of interactions with NA, but also hydrophobic/hydrophilic balance, complex size, surface charge, physiological stability, and NA escape procedure from the carrier. It is necessary to complete these investigations through studying the biodistribution and elimination of administered molecules. Indeed, knowledge and understanding of the pharmacokinetics and biodistribution mechanisms of drugs, such as NA complexes, in the body are key steps for the improvement of gene transfer systems and their transfection efficiency, in parallel with assessment of pharmacological and toxicological parameters.

This work was supported by grants from “Association Française contre les Myopathies” (Evry, France), “Vaincre la Mucoviscidose” (Paris, France), “Association de transfusion sanguine et de biogénétique Gaétan Saleün” (Brest, France), INSERM, SFR 148 Scinbios.

Nawal Belmadi was the recipient of a doctoral fellowship from “Conseil régional de Bretagne” and l’Université de Bretagne Occidentale. The authors thank Morgan Riou for her editorial assistance.

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

7 References

- [1] Kanwar, J. R., Kamalapuram, S. K., Kanwar, R. K., Targeting survivin in cancer: The cell-signaling perspective. *Drug Discov. Today* 2011, 16, 485–494.
- [2] Rollier, C. S., Reyes-Sandoval, A., Cottingham, M. G., Ewer, K., Hill, A. V., Viral vectors as vaccine platforms: Deployment in sight. *Curr. Opin. Immunol.* 2011, 23, 377–382.
- [3] Resnier, P., Montier, T., Mathieu, V., Benoit, J.-P., Passirani, C., A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer. *Biomaterials* 2013, 34, 6429–6443.
- [4] Ginn, S. L., Alexander, I. E., Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Wixon, J., Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update: Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *J. Gene Med.* 2013, 15, 65–77.
- [5] Moss, R. B., Milla, C., Colombo, J., Accurso, F. et al., Repeated aerosolized AAV-CPTR for treatment of cystic fibrosis: A randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum. Gene Ther.* 2007, 18, 726–732.
- [6] Goyenvalle, A., Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004, 306, 1796–1799.
- [7] Burton, E. A., Fink, D. J., Glotioso, J. C., Gene delivery using herpes simplex virus vectors. *DNA Cell Biol.* 2002, 21, 915–936.
- [8] Mitomo, K., Griesenbach, U., Inoue, M., Somerton, L. et al., Toward gene therapy for cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with sendai virus envelopes. *Mol. Ther.* 2010, 18, 1173–1182.
- [9] Weyland, M., Griveau, A., Bejaud, J., Benoit, J.-P. et al., Lipid nanocapsule functionalization by lipopeptides derived from human papillomavirus type-16 capsid for nucleic acid delivery into cancer cells. *Int. J. Pharm.* 2013, 454, 756–764.
- [10] Montier, T., Benvégnu, T., Jaffres, R.-A., Yaouanc, J.-J., Lehn, P., Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: A series of bio-inspired lipids as an example. *Curr. Gene Ther.* 2008, 8, 296–312.
- [11] Schlenk, F., Grund, S., Fischer, D., Recent developments and perspectives on gene therapy using synthetic vectors. *Theor. Deliv.* 2013, 4, 95–113.
- [12] Al-Dosari, M. S., Gao, X., Nonviral gene delivery: Principle, limitations, and recent progress. *AAPS J.* 2009, 11, 671–681.
- [13] Zhang, X.-X., McIntosh, T. J., Grinstaff, M. W., Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery. *Biochimie* 2012, 94, 42–58.
- [14] Huang, Q.-D., Ren, J., Ou, W.-J., Fu, Y. et al., Cationic lipids containing cyclen and ammonium moieties as gene delivery vectors: Cyclen-based cationic lipids for gene delivery. *Chem. Biol. Drug Des.* 2012, 79, 879–887.
- [15] Zhdanov, R. I., Podobed, O. V., Vlassov, V. V., Cationic lipid-DNA complexes – lipoplexes – for gene transfer and therapy. *Bioelectrochemistry* 2002, 58, 53–64.
- [16] Musacchio, T., Recent developments in lipid-based pharmaceutical nanocarriers. *Front. Biosci.* 2011, 16, 1388.
- [17] Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R. et al., Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987, 84, 7413–7417.
- [18] Leventis, R., Silvius, J. R., Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1990, 1023, 124–132.
- [19] Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. J. et al., Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 2550–2561.
- [20] Jurkiewicz, P., Olzyska, A., Langner, M., Hof, M., Headgroup hydration and mobility of DOTAP/DOPC bilayers: A fluorescence solvent relaxation study. *Langmuir* 2006, 22, 8741–8749.
- [21] Jiang, J., Yang, S., Wang, J., Yang, L. et al., Sequential treatment of drug-resistant tumors with RGD-modified liposomes containing siRNA or doxorubicin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010, 76, 170–178.
- [22] Laurent, V., Fraix, A., Montier, T., Cammas-Marion, S. et al., Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells: New means for drug metabolism and toxicity studies. *Biotechnol. J.* 2010, 5, 314–320.
- [23] Picquet, E., Le Ny, K., Delépine, P., Montier, T. et al., Cationic lipophosphoramidates and lipophosphoguanidines are very efficient for in vivo DNA delivery. *Bioconjug. Chem.* 2005, 16, 1051–1053.
- [24] Le Gall, T., Loizeau, D., Picquet, E., Carmoy, N. et al., A novel cationic lipophosphoramidate with diunsaturated lipid chains: Synthesis, physicochemical properties, and transfection Activities. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 1496–1508.
- [25] Lindberg, M. F., Carmoy, N., Le Gall, T., Fraix, A. et al., The gene transfection properties of a lipophosphoramidate derivative with two phytanyl chains. *Biomaterials* 2012, 33, 6240–6253.



Nawal Belmadi performed her Master’s research in Molecular and Cellular Biology at the University of Orleans, France. She performs her PhD in the Gene Transfer and Gene Therapy group of Prof Tristan Montier, at INSERM UMR 1078; France. She will defend her PhD in October 2015. Her thesis is titled “In vivo biodistribution of synthetic vectors for gene transfer in the context of gene therapy for cystic fibrosis”. She is recipient a doctoral fellowship from “Conseil Régional de Bretagne” and “l’Université de Bretagne Occidentale (UBO)”.



Prof. Tristan Montier is the leader of the Gene Transfer and Gene Delivery group at INSERM UMR 1078, France. He attended medical school at Western Brittany University (UBO) and the University Teaching Hospital of Brest, France.

- [26] Mével, M., Breuzard, G., Yaouanc, J.-J., Clément, J.-C. et al., Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate lipids: High efficiency of an imidazolium derivative. *ChemBioChem* 2008, 9, 1462–1471.
- [27] Welsch, K., Campbell, F., Kudsiya, L., Mohammadi, A. et al., Gene delivery using ternary lipopolyplexes incorporating branched cationic peptides: The role of peptide sequence and branching. *Mol. Pharm.* 2013, 10, 127–141.
- [28] Behr, J. P., Demeneix, B., Loeffler, J. P., Perez-Mutul, J., Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989, 86, 6982–6986.
- [29] Loeffler, J. P., Barthel, F., Feltz, P., Behr, J. P. et al., Lipopolyamine-mediated transfection allows gene expression studies in primary neuronal cells. *J. Neurochem.* 1990, 54, 1812–1815.
- [30] Kedika, B., Patri, S. V., Design, synthesis, and in vitro transfection biology of novel tocopherol based monocationic lipids: A structure-activity investigation. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 548–561.
- [31] Behr, J. P., L'éponge a protons: un moyen d'entrer dans une cellule auquel les virus n'ont pas pensé. *Med. Sci.* 1996, 12, 56–59.
- [32] Belmont, P., Aissasoui, A., Hauchecorne, M., Oudrhiri, N. et al., Aminoglycoside-derived cationic lipids as efficient vectors for gene transfection in vitro and in vivo. *J. Gene Med.* 2002, 4, 517–526.
- [33] Sainlos, M., Hauchecorne, M., Oudrhiri, N., Zertal-Zidani, S. et al., Kanamycin A-derived cationic lipids as vectors for gene transfection. *ChemBioChem* 2005, 6, 1023–1033.
- [34] Desigaux, L., Sainlos, M., Lambert, O., Chevre, R. et al., Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007, 104, 16534–16539.
- [35] Gao, X., Huang, L., A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 179, 280–285.
- [36] Hyde, S. C., Southern, K. W., Gileadi, U., Fitzjohn, E. M. et al., Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther.* 2000, 7, 1156–1165.
- [37] Vigneron, J. P., Oudrhiri, N., Fauquet, M., Vergely, L. et al., Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996, 93, 9682–9686.
- [38] Ruiz, F. E., Clancy, J. P., Perricone, M. A., Bebock, Z. et al., A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. *Hum. Gene Ther.* 2001, 12, 751–761.
- [39] Davies, L. A., Seguela, C., Varathalingam, A., Cheng, S. H. et al., Identification of transfected cell types following non-viral gene transfer to the murine lung. *J. Gene Med.* 2007, 9, 184–196.
- [40] Oudrhiri, N., Vigneron, J. P., Peuchmaur, M., Leclerc, T. et al., Gene transfer by guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial cells in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997, 94, 1651–1656.
- [41] Cardarelli, F., Pozzi, D., Bifone, A., Marchini, C., Caracciolo, G., Cholesterol-dependent macropinocytosis and endosomal escape control the transfection efficiency of lipoplexes in CHO living cells. *Mol. Pharm.* 2012, 9, 334–340.
- [42] David, S., Passirani, C., Carmoy, N., Morille, M. et al., DNA Nanocarriers for systemic administration: Characterization and in vivo bioimaging in healthy mice. *Mol. Ther. – Nucleic Acids* 2013, 2, e64.
- [43] Le Bihan, O., Chevre, R., Mornet, S., Garnier, B. et al., Probing the in vitro mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale. *Nucleic Acids Res.* 2010, 39, 1595–1609.
- [44] Tros de Iarduya, C., Sun, Y., Düzgünes, N., Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010, 40, 159–170.
- [45] Bousisif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D. et al., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 7297–7301.
- [46] Kadlecova, Z., Rajendra, Y., Matasci, M., Hacker, D. et al., Hyperbranched polylysine: A versatile, biodegradable transfection agent for the production of recombinant proteins by transient gene expression and the transfection of primary cells. *Macromol. Biosci.* 2012, 12, 794–804.
- [47] Tian, H., Lin, L., Jiao, Z., Guo, Z. et al., Polylysine-modified polyethylenimine inducing tumor apoptosis as an efficient gene carrier. *J. Controlled Release* 2013, 172, 410–418.
- [48] Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J.-J., Jaffrès, P.-A., Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers: Histidine-rich nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* 2009, 157, 166–178.
- [49] Kadlecova, Z., Rajendra, Y., Matasci, M., Baldi, L. et al., DNA delivery with hyperbranched polylysine: A comparative study with linear and dendritic polylysine. *J. Controlled Release* 2013, 169, 276–288.
- [50] Takeoka, S., Sarker, S. R., Aoshima, Y., Hokama, R. et al., Arginine-based cationic liposomes for efficient in vitro plasmid DNA delivery with low cytotoxicity. *Int. J. Nanomedicine* 2013, 8, 1361–1375.
- [51] Putnam, D., Polymers for gene delivery across length scales. *Nat. Mater.* 2006, 5, 439–451.
- [52] Kurosaki, T., Kitahara, T., Fumoto, S., Nishida, K. et al., Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and γ -polyglutamic acid for gene delivery systems. *Biomaterials* 2009, 30, 2846–2853.
- [53] Demeneix, B., Behr, J.-P., Polyethylenimine (PEI). *Adv. Genet.* 2005, 53, 217–230.
- [54] Davies, L. A., Hyde, S. C., Nunez-Alonso, G., Bazzani, R. P. et al., The use of CpG-free plasmids to mediate persistent gene expression following repeated aerosol delivery of pDNA/PEI complexes. *Biomaterials* 2012, 33, 5618–5627.
- [55] Densmore, C., Aerosol delivery of robust polyethylenimine – DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Mol. Ther.* 2000, 1, 180–188.
- [56] McLachlan, G., Davidson, H., Holder, E., Davies, L. A. et al., Pre-clinical evaluation of three non-viral gene transfer agents for cystic fibrosis after aerosol delivery to the ovine lung. *Gene Ther.* 2011, 18, 996–1005.
- [57] Davies, L. A., McLachlan, G., Sumner-Jones, S. G., Ferguson, D. et al., Enhanced lung gene expression after aerosol delivery of concentrated pDNA/PEI complexes. *Mol. Ther.* 2008, 16, 1283–1290.
- [58] Wong, S. P., Argyros, O., Howe, S. J., Harbottle, R. P., Systemic gene transfer of polyethylenimine (PEI) – plasmid DNA complexes to neonatal mice. *J. Controlled Release* 2011, 150, 298–306.
- [59] Jäger, M., Schubert, S., Ochrimenko, S., Fischer, D., Schubert, U. S., Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: Synthetic modification, characterization, and application. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 4755–4767.
- [60] Sun, J., Zeng, F., Jian, H., Wu, S., Conjugation with Betaine: A facile and effective approach to significant improvement of gene delivery properties of PEI. *Biomacromolecules* 2013, 14, 728–736.
- [61] Kunath, K., Merdan, T., Hegener, O., Häberlein, H., Kissel, T., Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer. *J. Gene Med.* 2003, 5, 588–599.
- [62] Grosse, S., Thévenot, G., Aron, Y., Duverger, E. et al., In vivo gene delivery in the mouse lung with lactosylated polyethylenimine, questioning the relevance of in vitro experiments. *J. Controlled Release* 2008, 132, 105–112.
- [63] Gabrielson, N. P., Pack, D. W., Acetylation of polyethylenimine enhances gene delivery via weakened polymer/DNA interactions. *Biomacromolecules* 2006, 7, 2427–2435.
- [64] Bertrand, E., Gonçalves, C., Billiet, L., Gomez, J. P. et al., Histidinylated linear PEI: A new efficient non-toxic polymer for gene transfer. *Chem. Commun.* 2011, 47, 12547–12549.

- [65] Doody, A. M., Korley, J. N., Dang, K. P., Zawaneh, P. N., Putnam, D., Characterizing the structure/function parameter space of hydrocarbon-conjugated branched polyethylenimine for DNA delivery in vitro. *J. Controlled Release* 2006, 116, 227–237.
- [66] Forrest, M. L., Meister, G. E., Koerber, J. T., Pack, D. W., Partial acetylation of polyethylenimine enhances in vitro gene delivery. *Pharm. Res.* 2004, 21, 365–371.
- [67] Mellet, C. O., Fernández, J. M. G., Benito, J. M., Cyclodextrin-based gene delivery systems. *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 1586–1608.
- [68] Yang, C., Wang, X., Li, H., Goh, S. H., Li, J., Synthesis and characterization of polyrotaxanes consisting of cationic α -cyclodextrins threaded on poly[(ethylene oxide)-*ran*-(propylene oxide)] as gene carriers. *Biomacromolecules* 2007, 8, 3365–3374.
- [69] Hwang, S. J., Bellocq, N. C., Davis, M. E., Effects of structure of β -cyclodextrin-containing polymers on gene delivery. *Bioconjug. Chem.* 2001, 12, 280–290.
- [70] Mishra, S., Heidel, J. D., Webster, P., Davis, M. E., Imidazole groups on a linear, cyclodextrin-containing polycation produce enhanced gene delivery via multiple processes. *J. Controlled Release* 2006, 116, 179–191.
- [71] Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H. J., Seligson, D. et al., Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 2010, 464, 1067–1070.
- [72] Ortega-Caballero, F., Mellet, C. O., Le Gourrielrec, L., Guilloleau, N. et al., Tailoring β -Cyclodextrin for DNA complexation and delivery by homogeneous functionalization at the secondary face. *Org. Lett.* 2008, 10, 5143–5146.
- [73] Martínez, Á., Ortiz Mellet, C., García Fernández, J. M., Cyclodextrin-based multivalent glycoconjugates: covalent and supramolecular conjugates to assess carbohydrate–protein interactions. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 4746–4773.
- [74] Han, S., Mahato, R. I., Kim, S. W., Water-soluble lipopolymer for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* 2001, 12, 337–345.
- [75] Mi Bae, Y., Choi, H., Lee, S., Ho Kang, S. et al., Dexamethasone-conjugated low molecular weight polyethylenimine as a nucleus-targeting lipopolymer gene carrier. *Bioconjug. Chem.* 2007, 18, 2029–2036.
- [76] Abbasi, M., Uludağ, H., Incani, V., Yu Ming Hsu, C., Jeffery, A., Further investigation of lipid-substituted poly(L-lysine) polymers for transfection of human skin fibroblasts. *Biomacromolecules* 2008, 9, 1618–1630.
- [77] Neamark, A., Suwantong, O., K. C., R. B., Hsu, C. Y. M. et al., Aliphatic lipid substitution on 2 kDa polyethylenimine improves plasmid delivery and transgene expression. *Mol. Pharm.* 2009, 6, 1798–1815.
- [78] Du, Y.-Z., Cai, L. L., Li, J., Zhao, M. D. et al., Receptor-mediated gene delivery by folic acid-modified stearic acid-grafted chitosan micelles. *Int. J. Nanomedicine* 2011, 6, 1559–1568.
- [79] Du, Y.-Z., Lu, P., Yuan, H., Zhou, J.-P., Hu, F.-Q., Quaternary complexes composed of plasmid DNA/protamine/fish sperm DNA/stearic acid grafted chitosan oligosaccharide micelles for gene delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 2011, 48, 153–159.
- [80] Hu, F.-Q., Chen, W.-W., Zhao, M.-D., Yuan, H., Du, Y.-Z., Effective antitumor gene therapy delivered by polyethylenimine-conjugated stearic acid-g-chitosan oligosaccharide micelles. *Gene Ther.* 2013, 20, 597–606.
- [81] Kakizawa, Y., Kataoka, K., Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, 54, 203–222.
- [82] Miyata, K., Oba, M., Kano, M. R., Fukushima, S. et al., Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor tissue. *Pharm. Res.* 2008, 25, 2924–2936.
- [83] Miyata, K., Oba, M., Nakanishi, M., Fukushima, S. et al., Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 16287–16294.
- [84] Sun, X., Liu, C., Liu, D., Li, F., Zhang, N., Novel biomimetic vectors with endosomal-escape agent enhancing gene transfection efficiency. *Int. J. Pharm.* 2012, 425, 62–72.
- [85] Boylan, N. J., Kim, A. J., Suk, J. S., Adstamongkonkul, P. et al., Enhancement of airway gene transfer by DNA nanoparticles using a pH-responsive block copolymer of polyethylene glycol and poly-L-lysine. *Biomaterials* 2012, 33, 2361–2371.
- [86] Cui, Z., Han, S.-J., Vangasser, D. P., Huang, L., Immunostimulation mechanism of LPD nanoparticle as a vaccine carrier. *Mol. Pharm.* 2005, 2, 22–28.
- [87] Huang, L., Lee, R., Folate-targeted, Anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 8481–8487.
- [88] Tagalakis, A. D., He, L., Saraiva, L., Gustafsson, K. T., Hart, S. L., Receptor-targeted liposome-peptide nanocomplexes for siRNA delivery. *Biomaterials* 2011, 32, 6302–6315.
- [89] Pelisek, J., Gaedtker, L., DeRouchey, J., Walker, G. F. et al., Optimized lipopolyplex formulations for gene transfer to human colon carcinoma cells under in vitro conditions. *J. Gene Med.* 2006, 8, 188–197.
- [90] Chen, Y., Bathula, S. R., Yang, Q., Huang, L., Targeted nanoparticles deliver siRNA to melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2010, 130, 2790–2798.
- [91] Schäfer, J., Höbel, S., Bakowsky, U., Aigner, A., Liposome-polyethylenimine complexes for enhanced DNA and siRNA delivery. *Biomaterials* 2010, 31, 6892–6900.
- [92] Moon, I. J., Kang, H., Seu, Y. B., Chang, B. C. et al., Marked transfection enhancement by the DPL (DNA/peptide/lipid) complex. *Int. J. Mol. Med.* 2007, 20, 429–437.
- [93] Mockey, M., Bouteau, E., Chandrashekar, V., Chaudhuri, A. et al., mRNA-based cancer vaccine: Prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes. *Cancer Gene Ther.* 2007, 14, 802–814.
- [94] Perche, F., Benvegna, T., Berchel, M., Lebegue, L. et al., Enhancement of dendritic cells transfection in vivo and of vaccination against B16F10 melanoma with mannoseylated histidylated lipopolyplexes loaded with tumor antigen messenger RNA. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2011, 7, 445–453.
- [95] Pichon, C., Midoux, P., Mannosylated and histidylated LPR technology for vaccination with tumor antigen mRNA. In: Rabinovich, P. M. (Ed.), *Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation*, Vol. 969. Humana Press, Totowa, NJ, 2013, pp. 247–274.
- [96] Li, S.-D., Huang, L., Surface-modified LPD nanoparticles for tumor targeting. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006, 1082, 1–8.
- [97] Morille, M., Montier, T., Legras, P., Carmoy, N. et al., Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting. *Biomaterials* 2010, 31, 321–329.
- [98] Billiet, L., Gomez, J.-P., Berchel, M., Jaffrès, P.-A. et al., Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipopolyplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line. *Biomaterials* 2012, 33, 2980–2990.
- [99] El-Sayed, A., Harashima, H., Endocytosis of Gene Delivery Vectors: From clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol. Ther.* 2013, 21, 1118–1130.
- [100] Hyvönen, Z., Hämäläinen, V., Ruponen, M., Lucas, E. et al., Elucidating the pre- and post-nuclear intracellular processing of 1,4-dihydropyridine based gene delivery carriers. *J. Controlled Release* 2012, 162, 167–175.

- [101] Boussif, O., Delair, T., Brua, C., Veron, L. et al., Synthesis of polyalylamine derivatives and their use as gene transfer vectors in vitro. *Bioconjug. Chem.* 1999, 10, 877–883.
- [102] Creusat, G., Rinaldi, A.-S., Weiss, E., Elbaghdadi, R. et al., Proton sponge trick for pH-sensitive disassembly of polyethylenimine-based siRNA delivery systems. *Bioconjug. Chem.* 2010, 21, 994–1002.
- [103] Pichon, C., Gonçalves, C., Midoux, P., Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 53, 75–94.
- [104] Hayet, A., Stoeber, M., Ritz, D., Engel, S. et al., Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J. Cell Biol.* 2010, 191, 615–629.
- [105] Safinya, C. R., Ewert, K. K., Leal, C., Cationic liposome–nucleic acid complexes: Liquid crystal phases with applications in gene therapy. *Liq. Cryst.* 2011, 38, 1715–1723.
- [106] Talbot, W. A., Zheng, L. X., Lentz, B. R., Acyl chain unsaturation and vesicle curvature alter outer leaflet packing and promote poly(ethylene glycol)-mediated membrane fusion. *Biochemistry (Mosc.)* 1997, 36, 5827–5836.
- [107] Gonçalves, C., Ardourel, M.-Y., Decoville, M., Breuzard, G. et al., An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression. *J. Gene Med.* 2009, 11, 401–411.
- [108] Mesika, A., A regulated, NFkB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Mol. Ther.* 2001, 3, 653–657.
- [109] Lechardeur, D., Sohn, K. J., Haardt, M., Joshi, P. B. et al., Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: A potential barrier to gene transfer. *Gene Ther.* 1999, 6, 482–497.
- [110] Bergon, J. M., Pun, S. H., Evaluation of an LC8-binding peptide for the attachment of artificial cargo to dynein. *Mol. Pharm.* 2007, 4, 119–128.
- [111] Tanaka, K., Kanazawa, T., Sugawara, K., Horiuchi, S. et al., A cytoplasm-sensitive peptide vector cross-linked with dynein light chain association sequence (DLCAS) enhances gene expression. *Int. J. Pharm.* 2011, 419, 231–234.
- [112] Pigeon, L., Gonçalves, C., Gosset, D., Pichon, C., Midoux, P., An E3-14.7K peptide that promotes microtubules-mediated transport of plasmid DNA increases polyplexes transfection efficiency. *Small* 2013, 9, 3845–3851.
- [113] Bire, S., Rouleux-Bonnin, F., Transposable elements as tools for reshaping the genome. It is a huge world after all! In: Bigot, Y. (Ed.), *Mobile Genetic Elements, Vol. 859*, Humana Press, Totowa, NJ, 2012, pp. 1–28.
- [114] Hackett, P. B., Ekker, S. C., Largaespada, D. A., McIvor, R. S., Sleeping beauty transposon-mediated gene therapy for prolonged expression. *Adv. Genet.* 2005, 54, 189–232.
- [115] Palazzoli, F., Bire, S., Bigot, Y., Bonnin-Rouleux, F., Landscape of chromatin control element patents: Positioning effects in pharmaceutical bioproduction. *Nat. Biotechnol.* 2011, 29, 593–597.
- [116] Koukidou, M., Klinakis, A., Reboulakis, C., Zagoraiou, I. et al., Germ line transformation of the olive fly *Bactrocera oleae* using a versatile transgenesis marker. *Insect Mol. Biol.* 2006, 15, 95–103.
- [117] Wilber, A., Frandsen, J., Geurts, J., Largaespada, D. et al., RNA as a source of transposase for sleeping beauty-mediated gene insertion and expression in somatic cells and tissues. *Mol. Ther.* 2006, 13, 625–630.
- [118] Zagoraiou, L., Drabek, D., Alexaki, S., Guy, J. A. et al., In vivo transposition of Minos, a Drosophila mobile element, in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, 98, 11474–11478.
- [119] De Wit, T., Dekker, S., Maas, A., Breedveld, G. et al., Tagged mutagenesis by efficient minos-based germ line transposition. *Mol. Cell Biol.* 2010, 30, 68–77.
- [120] Schwank, G., Koo, B.-K., Sasselli, V., Dekkers, J. F. et al., Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 2013, 13, 653–658.
- [121] Wu, Y., Liang, D., Wang, Y., Bai, M. et al., Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* 2013, 13, 659–662.
- [122] Oupický, D., Parker, A. L., Seymour, L. W., Laterally stabilized complexes of DNA with linear reducible polycations: Strategy for triggered intracellular activation of DNA delivery vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 8–9.
- [123] Pichon, C., LeCam, E., Guérin, B., Coulaud, D. et al., Poly[Lys-(AEDTP)]: A cationic polymer that allows dissociation of pDNA/cationic polymer complexes in a reductive medium and enhances polyfection. *Bioconjug. Chem.* 2002, 13, 76–82.
- [124] Erbacher, P., Roche, A. C., Monsigny, M., Midoux, P., The reduction of the positive charges of polylysine by partial gluconoylation increases the transfection efficiency of polylysine/DNA complexes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1997, 1324, 27–36.
- [125] Maury, B., Gonçalves, C., Tresset, G., Zeghal, M. et al., Influence of pDNA availability on transfection efficiency of polyplexes in non-proliferative cells. *Biomaterials* 2014, 35, 5977–5985.
- [126] Sheth, R. A., Hesketh, R., Kong, D. S., Wicky, S., Oklu, R., Barriers to drug delivery in interventional oncology. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 2013, 24, 1201–1207.
- [127] Gautam, A., Waldrep, J. C., Densmore, C. L., Aerosol gene therapy. *Mol. Biotechnol.* 2003, 23, 51–60.
- [128] Bally, M. B., Harvie, P., Wong, F. M., Kong, S. et al., Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999, 38, 291–315.
- [129] Meerasa, A., G. Huang, J., X. Gu, F., CH50: A revisited hemolytic complement consumption assay for evaluation of nanoparticles and blood plasma protein interaction. *Curr. Drug Deliv.* 2011, 8, 290–298.
- [130] Liu, Y., Liggitt, D., Zhong, W., Tu, G. et al., Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 24864–24870.
- [131] Ogris, M., Brunner, S., Schuller, S., Kircheis, R., Wagner, E., PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: Reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* 1999, 6, 595–605.
- [132] Simberg, D., The role of organ vascularization and lipoplex-serum initial contact in intravenous murine lipofection. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 39858–39865.
- [133] Belting, M., Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends Biochem. Sci.* 2003, 28, 145–151.
- [134] Mislick, K. A., Baldeschwieler, J. D., Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996, 93, 12349–12354.
- [135] Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A., Benoit, J.-P., Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* 2008, 29, 3477–3496.
- [136] Xu, Y., Szoka, F. C., Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry (Mosc.)* 1996, 35, 5616–5623.
- [137] Zelphati, O., Uyechi, L. S., Barron, L. G., Szoka, F. C., Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* 1998, 1390, 119–133.
- [138] Plank, C., Mechtler, K., Szoka, F. C., Wagner, E., Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: A potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum. Gene Ther.* 1996, 7, 1437–1446.

- [139] Tousignant, J. D., Gates, A. L., Ingram, L. A., Johnson, C. L. et al., Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid: Plasmid DNA complexes in mice. *Hum. Gene Ther.* 2000, *11*, 2493–2513.
- [140] Podolska, K., Stachurska, A., Hajdukiewicz, K., Malecki, M., Gene therapy prospects – intranasal delivery of therapeutic genes. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2012, *21*, 525–534.
- [141] Li, P., Liu, D., Sun, X., Liu, C., Liu, Y., Zhang, N., A novel cationic liposome formulation for efficient gene delivery via a pulmonary route. *Nanotechnology* 2011, *22*, 245104.
- [142] Chou, A. J., Gupta, R., Bell, M. D., Riewe, K. O. et al., Inhaled lipid cisplatin (ILC) in the treatment of patients with relapsed/progressive osteosarcoma metastatic to the lung. *Pediatr. Blood Cancer* 2013, *60*, 580–586.
- [143] Stern, M., Caplen, N. J., Browning, J. E., Griesenbach, U. et al., The effect of mucolytic agents on gene transfer across a CF sputum barrier in vitro. *Gene Ther.* 1998, *5*, 91–98.
- [144] Alton, E. W., Baker, A., Baker, E., Boyd, A. C. et al., The safety profile of a cationic lipid-mediated cystic fibrosis gene transfer agent following repeated monthly aerosol administration to sheep. *Biomaterials* 2013, *34*, 10267–10277.
- [145] Hagstrom, J., A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Mol. Ther.* 2004, *10*, 386–398.
- [146] Toumi, H., Hegge, J., Subbotin, V., Noble, M. et al., Rapid intravascular injection into limb skeletal muscle: A damage assessment study. *Mol. Ther.* 2006, *13*, 229–236.
- [147] Zhang, G., Wooddell, C. I., Hegge, J. O., Griffin, J. B. et al., Functional efficacy of dystrophin expression from plasmids delivered to *mdx* mice by hydrodynamic limb vein injection. *Hum. Gene Ther.* 2010, *21*, 221–227.
- [148] Qiao, C., Li, J., Zheng, H., Bogan, J. et al., Hydrodynamic limb vein injection of adeno-associated virus serotype 8 vector carrying canine myostatin propeptide gene into normal dogs enhances muscle growth. *Hum. Gene Ther.* 2009, *20*, 1–10.
- [149] Hegge, J. O., Wooddell, C. I., Zhang, G., Hagstrom, J. E. et al., Evaluation of hydrodynamic limb vein injections in nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* 2010, *21*, 829–842.
- [150] Fan, Z., Kocis, K., Valley, R., Howard, J. F. et al., Safety and feasibility of high-pressure transvenous limb perfusion with 0.9% saline in human muscular dystrophy. *Mol. Ther.* 2012, *20*, 456–461.
- [151] Itaka, K., Osada, K., Morii, K., Kim, P. et al., Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle. *J. Controlled Release* 2010, *143*, 112–119.
- [152] Baker, M., Whole-animal imaging: The whole picture. *Nature* 2010, *463*, 977–980.
- [153] Bikram, M., Lee, M., Chang, C.-W., Janát-Amsbury, M.-M. et al., Long-circulating DNA-complexed biodegradable multiblock copolymers for gene delivery: degradation profiles and evidence of dysopsonization. *J. Controlled Release* 2005, *103*, 221–233.
- [154] Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., Farokhzad, O. C., Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* 2008, *5*, 505–515.
- [155] Hirsjärvi, S., Dufort, S., Gravier, J., Texier, I. et al., Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2013, *9*, 375–387.
- [156] Schellekens, H., Hennink, W. E., Brinks, V., The immunogenicity of polyethylene glycol: Facts and fiction. *Pharm. Res.* 2013, *30*, 1729–1734.
- [157] Halma, C., Daha, M. R., van Es, L. A., In vivo clearance by the mononuclear phagocyte system in humans: An overview of methods and their interpretation. *Clin. Exp. Immunol.* 1992, *89*, 1–7.
- [158] Hirsjärvi, S., Sancey, L., Dufort, S., Belloche, C. et al., Effect of particle size on the biodistribution of lipid nanocapsules: Comparison between nuclear and fluorescence imaging and counting. *Int. J. Pharm.* 2013, *453*, 594–600.
- [159] Letrou-Bonneval, E., Chèvre, R., Lambert, O., Costet, P. et al., Galactosylated multimodal lipoplexes for specific gene transfer into primary hepatocytes. *J. Gene Med.* 2008, *10*, 1198–1209.
- [160] Steirer, L. M., Park, E. I., Townsend, R. R., Baenziger, J. U., The asialoglycoprotein receptor regulates levels of plasma glycoproteins terminating with sialic acid 2,6-galactose. *J. Biol. Chem.* 2009, *284*, 3777–3783.
- [161] Nurunnabi, M., Khatun, Z., Huh, K. M., Park, S. Y. et al., In vivo biodistribution and toxicology of carboxylated graphene quantum dots. *ACS. Nano.* 2013, *7*, 6858–6867.
- [162] Huh, M. S., Lee, S.-Y., Park, S., Lee, S. et al., Tumor-homing glycol chitosan/polyethylenimine nanoparticles for the systemic delivery of siRNA in tumor-bearing mice. *J. Controlled Release* 2010, *144*, 134–143.
- [163] David, S., Resnier, P., Guillot, A., Pitard, B. et al., siRNA LNCs – A novel platform of lipid nanocapsules for systemic siRNA administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012, *81*, 448–452.
- [164] Shahzad, M. M., Mangala, L. S., Han, H. D., Lu, C. et al., Targeted delivery of small interfering RNA using reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles. *Neoplasia* 2011, *13*, 309–319.
- [165] Tanaka, T., Mangala, L. S., Vivas-Mejia, P. E., Nieves-Alicea, R. et al., Sustained small interfering RNA delivery by mesoporous silicon particles. *Cancer Res.* 2010, *70*, 3687–3696.
- [166] Liu, F., Shollenberger, L. M., Conwell, C. C., Yuan, X., Huang, L., Mechanism of naked DNA clearance after intravenous injection. *J. Gene Med.* 2007, *9*, 613–619.
- [167] Whitmore, M., Li, S., Huang, L., LPD lipopolyplex initiates a potent cytokine response and inhibits tumor growth. *Gene Ther.* 1999, *6*, 1867–1875.



Cover illustration

The cover of this regular issue of BT is inspired by several articles in which Chinese hamster ovary (CHO) cells were used. These articles include metabolite profiling in CHO cells, the one-step generation of a triple knockout line using CRISPR-Cas technology and analysis of antibody glycosylation patterns in different CHO cell lines.
© asolo79 – Fotolia.com

Biotechnology Journal – list of articles published in the September 2015 issue.

Review

Viral vaccines and their manufacturing cell substrates: New trends and designs in modern vaccinology

Ana F. Rodrigues, Hugo R. Soares, Miguel R. Guerreiro, Paula M. Alves and Ana S. Coroadinha

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201400387>

Review

Constructing kinetic models of metabolism at genome-scales: A review

Shyam Srinivasan, William R. Cluett and Radhakrishnan Mahadevan

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201400522>

Review

Dynamic metabolic engineering: New strategies for developing responsive cell factories

Irene M. Brockman and Kristala L. J. Prather

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201400422>

Review

Synthetic vectors for gene delivery: An overview of their evolution depending on routes of administration.

Nawal Belmadi, Patrick Midoux, Pascal Loyer, Catherine Passirani, Chantal Pichon, Tony Le Gall, Paul-Alain Jaffres, Pierre Lehn and Tristan Montier

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201400841>

Research Article

Design of experiments reveals critical parameters for pilot-scale freeze-and-thaw processing of L-lactic dehydrogenase

Ulrich Roessl, Sebastian Humi, Stefan Leitgeb and Bernd Nidetzky

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201400766>

Research Article

Systematic interpolation method predicts protein chromatographic elution from batch isotherm data without a detailed mechanistic isotherm model

Arch Creasy, Gregory Barker, Yan Yao and Giorgio Carta

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201500089>

Research Article

A global RNA-seq-driven analysis of CHO host and production cell lines reveals distinct differential expression patterns of genes contributing to recombinant antibody glycosylation

Jennifer D. Könitzer, Markus M. Müller, Germán Leparo, Martin Pauers, Jan Bechmann, Patrick Schulz, Jochen Schaub, Barbara Enenkel, Tobias Hildebrandt, Martin Hampel and Anne B. Tolstrup

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201400652>

Research article

A Weibull statistics-based lignocellulose saccharification model and a built-in parameter accurately predict lignocellulose hydrolysis performance

Mingyu Wang, Lijuan Han, Shasha Liu, Xuebing Zhao, Jinghua Yang, Soh Kheang Loh, Xiaomin Sun, Chenxi Zhang and Xu Fang

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201400723>

Research Article

Metabolite profiling of CHO cells: Molecular reflections of bioprocessing effectiveness

Christopher A. Sellick, Alexandra S. Croxford, Arfa R. Maqsood, Gill M. Stephens, Hans V. Westerhoff, Royston Goodacre and Alan J. Dickson

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201400664>

Research Article

One-step generation of triple knockout CHO cell lines using CRISPR/Cas9 and fluorescent enrichment

Lise Marie Grav, Jae Seong Lee, Signe Gerling, Thomas Beuchert Kallehauge, Anders Holmgaard Hansen, Stefan Kol, Gyun Min Lee, Lasse Ebdrup Pedersen and Helene Fastrup Kildegaard

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201500027>

Research Article

Enhanced extraction of proteins using cholinium-based ionic liquids as phase-forming components of aqueous biphasic systems

Maria V. Quental, Magda Caban, Matheus M. Pereira, Piotr Stepnowski, João A. P. Coutinho and Mara G. Freire

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201500003>

Research Article

Targeting mitosis-regulating genes in cisplatin-sensitive and -resistant melanoma cells: A live-cell RNAi screen displays differential nucleus-derived phenotypes

Holger Erfle, Könül Pashayeva, Nathalie Harder, Lei Zhang, Karl Rohr, Dirk Schadendorf, Selma Ugurel and Michael Keese

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201400501>

Research Article

Modulating secretory pathway pH by proton channel co-expression can increase recombinant protein stability in plants

Philippe V. Jutras, Marc-André D'Aoust, Manon M.-J. Couture, Louis-Philippe Vézina, Marie-Claire Goulet, Dominique Michaud, Frank Sainsbury

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201500056>

Biotech Method

Ca²⁺-independent sortase-A exhibits high selective protein ligation activity in the cytoplasm of *Escherichia coli*

Hidehiko Hirakawa, Suguru Ishikawa and Teruyuki Nagamune

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201500012>

Biotech Method

Adaptation to high throughput batch chromatography enhances multivariate screening

Gregory Barker, Joseph Calzada, Sibylle Herzer and Siegfried Rieble

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201400671>

Biotech Method

Sortase A-mediated synthesis of ligand-grafted cyclized peptides for modulating a model protein-protein interaction

Jing Zhang, Satoshi Yamaguchi and Teruyuki Nagamune

<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201500013>

Chapitre IV : Partie Expérimentale

1 Formulation des lipides cationiques

À travers la collaboration entre l'équipe « Phosphore et vectorisation » du Pr. Paul-Alain Jaffrès de l'unité CNRS 6521 et l'équipe « Thérapie Génique et transfert de gènes » du Pr. Tristan Montier de l'unité INSERM 1078, plusieurs familles de lipides cationiques ont été développées et utilisés dans les études expérimentales décrites ci-dessous.

Mes travaux de thèse ont porté sur le développement et la biodistribution des vecteurs synthétiques après administration systémique chez la souris. Pour cela, des sondes fluorescentes lipidiques neutres ont été synthétisées et formulées avec le lipophosphoramidate KLN47 (Figure 38). Ces lipophosphoramidates fluorescents possèdent un seul fluorophore localisé au niveau de la tête polaire. Différentes sondes fluorescentes ont été utilisées, principalement la cyanine, naphthalimide, NBD (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl). Les sondes fluorescentes ont été sélectionnées de sorte à concevoir des lipides présentant des propriétés fluorescentes qui couvrent un large spectre d'émission et d'excitation, et qui soient compatibles avec diverses applications (in vitro et in vivo).

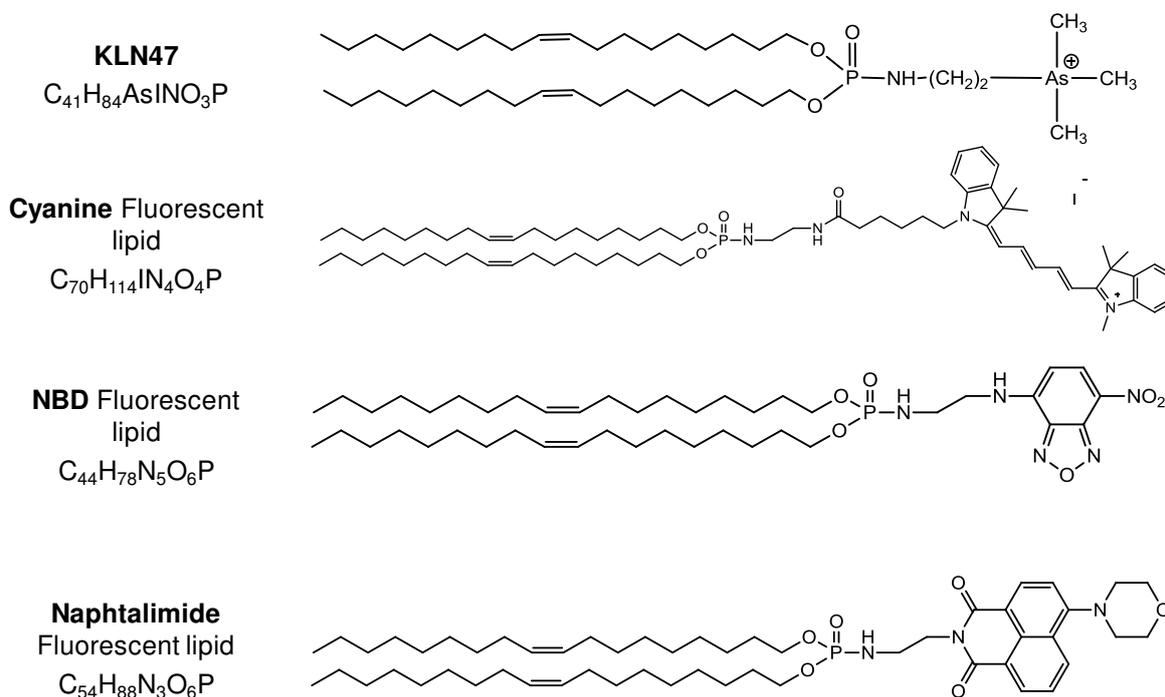


Figure 38 : Structures chimiques du lipophosphoramidate KLN47 et des lipides fluorescents

Chapitre IV : Partie Expérimentale

Ces lipides fluorescents neutres ont été incorporés à un rapport molaire faible (5%) avec le KLN47 afin de produire des solutions liposomales fluorescentes en modifiant le moins possible les propriétés physicochimiques du lipide cationique. Ces nouveaux composés ont été formulés à différentes concentrations, 1.5 mM pour l'usage in vitro, 11.5 et 23 mM pour les essais in vivo. Plusieurs formulations contenant différents fluorochromes ont été obtenues (Tableau II). Elles ont ensuite été caractérisées en termes de taille et de potentiel zêta (Tableau II).

Tableau II : Caractéristiques physicochimiques des lipides fluorescents

Formulations	Taille (nm)	Poly Index	Potential ζ (mV)
KLN47 _a —1.5 mM, 1.3 mg/mL	220.9	-	+60.2
FL1A: KLN47 _a —1.5 mM + FL Cyanine 5 mol %	189	-	+44.0
FL2A: KLN47 _a —1.5 mM + FL NBD 5 mol %	167.5	0.561	+53.1
FL2B: KLN47 _a —1.5 mM + FL NBD 10 mol %	205.0	0.418	+43.0
FL3A: KLN47 _a —1.5 mM + FL Naphtalimide 5 mol %	353.0	0.668	+50.5
FL3B: KLN47 _a —1.5 mM + FL Naphthalimide 10 mol %	354.8	0.477	+56.2
KLN47 _b —11.5 mM, 10 mg/mL	234.8	0.560	+58.4
FL1B: KLN47 _b —11.5 mM + FL Cyanine 5 mol %	141.4	0.714	+48.1
KLN47 _c —23 mM, 20 mg/mL	286.8	0.792	+65.9
FL1C: KLN47 _c —23 mM + FL Cyanine 5 mol %	164.5	0.474	+54.4

Avant toute utilisation in vivo, la capacité de condensation et de transfection sur lignées cellulaires des nouveaux composés a été évaluée. Par la suite, grâce aux techniques d'imagerie des études de biodistribution après injection systémique, ont été menées chez la souris saine avec l'une des formulations (FL1C : 23 mM, Cyanine). En effet, nous avons choisi d'utiliser la formulation la plus concentrée pour réduire le volume à injecter, limitant par conséquent les éventuels effets toxiques, et marquée à la cyanine pour sa compatibilité pour l'usage in vivo. Le stabilisateur stérique DSPE-PEG₂₀₀₀ a été utilisé en combinaison avec certains lipides cationiques pour prévenir les risques d'opsonisation et d'élimination des complexes par les macrophages. En effet, lors des essais in vivo il est important d'avoir des complexes stables et concentrés avec une circulation prolongée dans l'organisme [584,743].

La seconde partie de mon projet a porté sur l'évaluation de nouveaux lipophosphoramidates cationiques possédant soit deux chaînes lipidiques identiques (appelés les lipides cationiques symétriques), soit deux chaînes lipidiques différentes (nommés lipides cationiques asymétriques). Les objectifs de ce travail sont tout d'abord l'optimisation des méthodes de synthèse et de formulation des lipophosphoramidates, puis dans un second temps, d'évaluer l'impact de la présence de deux chaînes lipidiques différentes sur la

Chapitre IV : Partie Expérimentale

structure, les propriétés physicochimiques et sur l'efficacité de transfection en comparaison avec les lipides symétriques. Une série de sept lipophosphoramidates asymétriques a ainsi été synthétisée. Cette dernière comprend des chaînes lipidiques saturées (C12:0, C14:0, C18:0), des chaînes alkyles substitués (phytanyles), des chaînes alkyles insaturées (oléyles) et un groupement cholestérol. La comparaison des efficacités de transfection des lipides symétriques, non-symétriques et de la lipofectamine 2000 a été réalisée sur modèles cellulaires.

Dans le cadre de ma thèse, d'autres formulations ont également été évaluées dans le cadre du transfert de gènes. Cette série de lipides cationiques est caractérisée par un groupe fonctionnel phosphate qui agit comme un agent de liaison pour relier les deux chaînes lipidiques cationiques avec la tête polaire. La liaison entre les groupements mono ou dicationiques et le groupement phosphate se fait via un espaceur de type aryle. Différentes têtes polaires ont également été utilisées, afin de produire des molécules amphiphiles possédant soit une charge cationique, soit deux charges cationiques (N-méthyl-imidazolium, pyridinium, triméthylammonium). L'efficacité de transfection de ces nouvelles molécules a ensuite été évaluée sur des lignées cellulaires différentes.

Il existe différentes méthodes de préparation des liposomes selon la nature des lipides utilisés et le type de particules que l'on veut obtenir. On distingue principalement la formulation en eau par hydratation d'un film lipidique, les formulations par injection éthanolique [744], l'injection à l'éther et la méthode d'évaporation en phase inverse. La méthode la plus utilisée est celle d'hydratation d'un film lipidique. Le principe de la formulation en eau est le suivant : une quantité de lipides est pesée puis dissoute dans un solvant organique le chloroforme. Le solvant est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un film lipidique homogène. Le film lipidique ainsi obtenu est hydraté par ajout d'un volume d'eau stérile permettant d'obtenir la concentration souhaitée (mM). Après la période d'hydratation qui est variable en fonction du vecteur, la solution est vortexée et soniquée jusqu'à l'obtention d'une solution liposomale homogène. La taille des liposomes et le potentiel zêta sont déterminés pour chaque formulation à l'aide d'un zétasizer.

2 Plasmide

Le plasmide pGM144 de 3759 pb a la particularité d'être entièrement CpG-free (Figure 39). Il a été conçu ainsi dans le but : (i) d'obtenir une expression prolongée du transgène au niveau des cellules épithéliales pulmonaires, et (ii) afin d'éliminer ou de réduire la réponse inflammatoire liée à la présence des dinucléotides CG [495,557]. Le pGM144 sous le contrôle

Chapitre IV : Partie Expérimentale

du promoteur du facteur d'élongation humain 1 α (hECF1 α), associé à l'enhancer du CMV humain, ainsi qu'une forme CpG-free de l'origine de réplication R6K code pour le gène de la luciférase. Ce plasmide est amplifié à 34°C dans la souche GT115 d'E. coli.

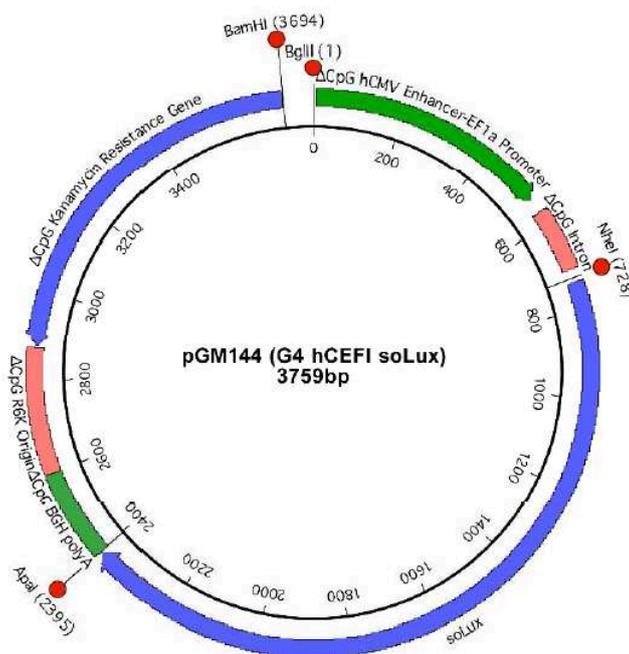


Figure 39 : carte de restriction du plasmide pGM144 ([557])

Après amplification, les plasmides sont extraits et purifiés avec le kit Transfection grade, endotoxin-free plasmid DNA purification kit (Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Le principe repose sur une lyse alcaline des membranes bactériennes, suivie d'une purification du plasmide par chromatographie échangeuse d'anions. L'ADN plasmidique est alors concentré par précipitation à l'alcool après plusieurs lavages de la colonne. Les plasmides sont ensuite repris dans de l'eau dépourvue d'endotoxines. La concentration en ADN est déterminée par un spectrophotomètre à 260 nm. Quant à la pureté de la solution d'acides nucléiques est estimée par le rapport A_{260}/A_{280} qui doit être compris entre 1.8 et 2. Une digestion enzymatique suivie d'une électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose est ensuite réalisée pour confirmer l'identité du plasmide.

3 Complexation d'ADN

Avant toute évaluation biologique, il est important de vérifier la capacité des composés synthétisés à complexer l'ADN afin de déterminer le rapport de charge (CR) pour lequel la complexation de l'ADN est totale. Le CR est défini par le nombre de charges positives portées par le lipide cationique rapporté au nombre de charges négatives portées par l'acide

Chapitre IV : Partie Expérimentale

nucléique (ADN). Pour cela 1 µg de plasmide est mélangé avec différentes quantités de lipide cationique de sorte à obtenir des CRs allant de 1 à 8. Les complexes sont préparés soit en OptiMEM (Gibco) pour les essais in vitro, soit en NaCl 0.9% pour les tests in vivo. Après incubation à température ambiante, 10 à 20 µL de chaque lipoplexe sont déposés sur gel d'agarose 0.8% et mis à migrer pendant 20 minutes environ à 100 V, 90 mA. Le gel est préalablement coloré par le bromure d'éthidium (10 mg/mL), afin de pouvoir le visualiser par la suite au moyen d'un transilluminateur à UV (Fischer Bioblock). Après migration, si l'ADN n'a pas été entièrement complexé, une bande sera visible sous UV. À l'inverse, lorsque l'ADN est totalement complexé, le BET n'est plus capable de s'intercaler entre les acides nucléiques et aucune bande ne sera donc observée. L'ADN seul est utilisé comme contrôle afin de déterminer le niveau de complexation d'ADN aux différents CRs.

4 Évaluation sur modèles cellulaires

4.1 Lignées cellulaires

L'efficacité de transfection des lipides cationiques a été évaluée sur différentes lignées cellulaires en fonction des applications envisagées. Dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose, deux lignées d'épithélium bronchique sauvage (16HBE14o-) et homozygotes pour la mutation $\Delta F508$ (CFBE41o-) ont été utilisées. D'autres lignées d'origine cancéreuses ont également été utilisées. Elles dérivent respectivement des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain (A549), d'adénocarcinome du col de l'utérus (HeLa) et du mélanome humain (SkMel28). Les cellules sont cultivées en EMEM (16HBE, CFBE, SkMel28) et en DMEM (A549, HeLa) à 37°C sous atmosphère enrichie en CO₂.

4.2 Préparation des complexes

Les solutions de liposomes sont stockées à 4°C, et avant leur utilisation, elles sont remises à température ambiante puis soniquées afin d'homogénéiser la formulation. Les lipoplexes sont préparés en OptiMEM (Lonza). Pour cela, 0.25 µg d'ADN plasmidique (pGM144) sont mélangées avec des quantités appropriées de lipides cationiques correspondant aux CRs allant de 1 à 8. Les complexes sont ensuite incubés 1 heure à température ambiante avant dépôt sur cellules.

4.3 Transfection cellulaire

L'efficacité de transfection des lipides cationiques a été évaluée sur différentes lignées cellulaires à l'aide du système de gène rapporteur (Luc). Brièvement, Les cellules sont ensemencées préalablement en plaques 96 puits à raison de 25.000 cellules par puits et incubées pendant 1 nuit à 37°C. Chaque condition est testée en triplicat. Le lendemain, 30 µL

Chapitre IV : Partie Expérimentale

de chaque complexe préalablement préparé sont déposés sur les cellules. La lipofectamine 2000 (Invitrogen), l'ADN seul et les cellules non transfectées sont utilisés comme contrôles pour déterminer le taux de transfection. Les cultures cellulaires sont ensuite remises à l'étuve jusqu'à la révélation.

4.4 Révélation de l'expression du transgène

48 heures après la mise en contact des cellules avec les lipoplexes, l'efficacité de transfection est révélée par mesure de l'expression du gène rapporteur luc dans les cellules. La révélation se fait en 3 trois étapes : lyse des cellules, dosage de l'activité de luciférase et dosage des protéines totales.

4.4.1 Lyse cellulaire

Le milieu de culture est retiré, puis 50 μL de PLB 0.5X (Passive Lysis Buffer, Promega) sont ajoutées aux cellules. Les plaques sont ensuite congelées à -20°C pour quelques heures ou jours. Les cellules sont par la suite décongelées à température ambiante et les lysats cellulaires sont prélevés pour réaliser les mesures de luminescence et le dosage protéique.

4.4.2 Dosage de l'activité luciférase

L'activité luciférase est mesurée dans les cellules transfectées par le kit Luciferase Assay System (Promega) en suivant les recommandations du fabricant. Le test est basé sur la catalyse de la réaction d'oxydation de la luciférine en oxyluciférine par la luciférase de luciole en utilisant le complexe $\text{ATP}\cdot\text{Mg}^{2+}$ comme co-substrat (Figure 40). Cette réaction génère de la lumière sous forme de photons proportionnelle à la quantité de protéines présentes (Figure 40). Cette émission de photons est donc quantifiable grâce à un luminomètre de plaques (MLX[®] Microtiter Plate Luminometer, Dynex). Les résultats sont exprimés en Relative Light Units (RLU).

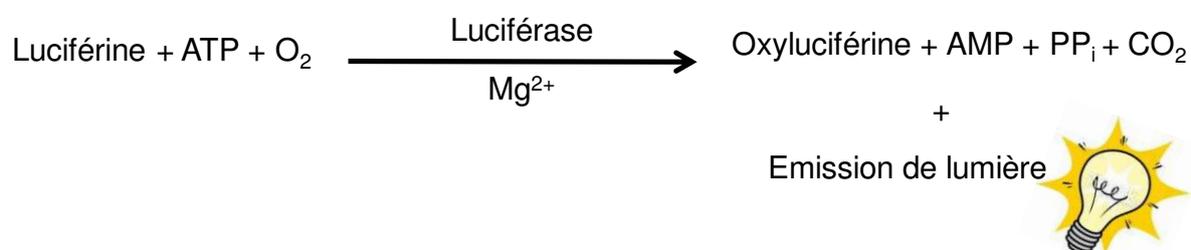


Figure 40: Représentation schématique de la réaction de chimiluminescence lors de la quantification de l'activité de la luciférase.

Chapitre IV : Partie Expérimentale

4.4.3 Dosage des protéines totales

La quantité des protéines dans chaque puits est mesurée à 540nm en utilisant la méthode photométrique à l'acide bicinchonique (BCA protein assay reagent kit, Interchim). Pour cela 200 μ L du réactif reconstitué sont ajoutées par puits, puis les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 minutes. Le test repose sur le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin, qui transforme ainsi les ions cuivre II en ions cuivre I. Les ions qui en résultent, se complexent alors avec l'acide bicinchonique et forment un complexe de couleur violet (Figure 41). En parallèle, une gamme étalon d'albumine de sérum de bovin (BSA) est réalisée afin d'associer chaque absorbance à une concentration donnée en protéines. L'efficacité de transfection est exprimée en RLU / mg des protéines totales, et permet d'évaluer comparer chaque formulation.



Figure 41 : Représentation schématique des réactions chimiques intervenant lors du dosage des protéines par le kit BC Assay

4.5 Évaluation de la cytotoxicité

La cytotoxicité des lipoplexes est évaluée par le kit Toxilight Bioassay (Lonza). Ce kit mesure par chimiluminescence, le relargage dans le milieu de culture, d'une enzyme adénylate kinase normalement présente uniquement dans le cytoplasme des cellules. La présence de cette dernière dans le milieu de culture est un indicateur de l'altération des membranes cellulaires reflétant la cytotoxicité des formulations étudiées. Pour cela, deux heures après le dépôt de complexes sur les cellules, 20 μ L de surnageant ont été prélevés dans chaque puits, afin d'estimer le taux d'adénylate kinase dans le milieu. La mesure se fait en deux étapes. D'abord en présence de l'adénylate kinase les molécules d'ADP sont transformées en ATP. Ensuite, ces molécules d'ATP sont utilisées comme co-facteur par la luciférase pour l'émission de lumière en présence de luciférine (Figure 42). L'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la concentration d'adénylate kinase et est mesurée en utilisant un luminomètre. Les résultats sont exprimés en RLU. Il s'agit ici d'estimer la toxicité cellulaire d'un complexe par rapport à des contrôles négatifs.

Chapitre IV : Partie Expérimentale

5.2 Administration systémique

Les complexes sont injectés via la veine caudale de la queue. Les souris sont d'abord exposées à la lumière d'une lampe pour chauffer et mieux dilater les veines. Ensuite elles sont maintenues sous un bécher pour injection des complexes.

5.3 Suivi des complexes in vivo par biofluorescence

L'imagerie par fluorescence a été effectuée à différents temps (1^h, 3^h, 5^h, 24^h,...etc) post-injection, en utilisant l'appareil de biofluorescence NightOWL II (Berthold Technologies, Germany) à l'aide d'une caméra préalablement refroidie à -70°C. En considérant les propriétés fluorescentes de la cyanine, les filtres d'excitation 630 nm et d'émission 655 nm ont été sélectionnés. Le faisceau de lumière est maintenu constant pour chaque acquisition de fluorescence, ce qui est idéal avec la lampe annulaire. En effet, comme la lampe annulaire est toujours placée à la même hauteur, l'énergie d'excitation de l'échantillon sera toujours la même.

Les souris sont tout d'abord anesthésiées par un mélange d'air-isoflurane (4%), puis placées dans la chambre noire du système d'imagerie (Berthold, NightOWL II). Elles sont maintenues sous anesthésie air-isoflurane 2% tout au long de l'acquisition. L'intensité de fluorescence est mesurée sur souris endormie pendant une acquisition d'une seconde, et le signal de fluorescence obtenu est superposé sur l'image de chaque souris correspondante. Les images de fluorescence sont prises dans différentes positions afin d'avoir une vue générale de la biodistribution de la fluorescence et ainsi mieux localiser et identifier les organes fluorescents. Les résultats sont exprimés en photon/pixel/seconde.

5.4 Quantification de l'expression du transgène par bioluminescence

L'expression du gène rapporteur (luciférase) est réalisée 24 heures après administration des complexes par bioluminescence. Pour cela, les souris reçoivent d'abord 200 µL de luciférine (à 20 mg/mL en tampon Hépès 20 mM ; Luciferins, FluoProbes[®], Interchim) par voie intrapéritonéale. 2 minutes après, les souris anesthésiées par un mélange air-isoflurane 4% sont placées dans l'appareil d'imagerie (NightOWL II ; Berthold Technologies, Germany), où elles sont maintenues endormies avec un mélange air-isoflurane à 2% tout au long de l'acquisition. L'émission de photons est mesurée grâce à un appareil d'imagerie in vivo (NightOWL II ; Berthold Technologies, Germany) équipé d'une caméra CCD (Charged Coupled Device) préalablement refroidie à -70°C. Les images de bioluminescence sont acquises en mode Lum B8x8 pendant 4 minutes. Le traitement d'images est réalisé à l'aide du

Chapitre IV : Partie Expérimentale

logiciel WinLight 32 (WinLight 32; Berthold Technologies, Germany). Le signal est quantifié dans les régions d'intérêt et exprimé en photon/seconde.

5.5 Biofluorescence sur organes isolés

Les animaux sont sacrifiés à différents temps post-administration après avoir été imagés et les organes (poumons, cœur, foie, rate, reins et intestins) sont prélevés pour une analyse en fluorescence. L'imagerie de fluorescence est une technique non-invasive et simple à mettre au point. Néanmoins, l'absorption et la diffusion de la lumière dépendent largement de la profondeur des tissus. Des problèmes d'auto-fluorescence et de photo-blanchiment peuvent également être observés. Ainsi le profil de biodistribution des molécules fluorescentes doit être étudié de la meilleure manière possible. Pour cela, des images de fluorescence sur organes isolés sont prises 24 heures post-injection, afin de mieux localiser et identifier les organes fluorescents et ainsi estimer l'intensité du signal de la manière la plus rigoureuse possible. Les organes sont immédiatement placés dans l'appareil d'imagerie (NightOWL ; Berthold Technologies, Germany), et les images sont acquises de la même manière que pour les souris entières, pendant un temps d'acquisition d'une seconde. Le signal de fluorescence est ensuite superposé avec la photo des organes correspondants.

5.6 Analyse de l'atteinte hépatique

Afin d'évaluer la toxicité générale que peuvent induire nos lipoplexes, un dosage des transaminases hépatiques ALT (Alanine Aminotransférases) et AST (Aspartate Aminotransférases) est réalisé à partir du plasma. Pour cela, des prélèvements sanguins sont effectués à différents temps post-injection à partir de la veine saphène. La méthode utilisée est celle décrite par Hem et al. en 1998 [745]. Brièvement, les souris sont maintenues dans des tubes falcon percés de 50 mL, et une de leurs pattes arrière est tirée vers l'extérieur. La veine saphène est mise en évidence par compression abdominale, et piquée par la suite. 200 à 300 μ L de sang sont récoltées dans des microvettes héparinées (Microvette CB300, Sarstedt). À la fin du prélèvement, l'hémorragie est stoppée à l'aide d'une compresse. Les échantillons de sang sont immédiatement centrifugés à 10000 g pendant 2 minutes à 4°C. Le plasma est récupéré et stocké à -20°C. L'activité des enzymes hépatiques (AST et ALT) est dosée à l'aide des kits commerciaux (ALT/GPT et AST/GOT; Elitech). Le principe du kit est basé sur la cinétique d'absorbance à 340 nm, qui reflète l'oxydation du NADH en NAD lorsque les transaminases sont en contact avec leurs substrats respectifs. L'activité des enzymes augmente essentiellement en cas d'hépatite, mais aussi lors d'une atteinte cardiaque aigue, ou

Chapitre IV : Partie Expérimentale

d'une atteinte musculaire. Les résultats sont exprimés en unités internationales / litre de sang (UI/L).

Chapitre V : Résultats

1 Évaluation de nouveaux lipophosphoramidates fluorescents pour le transfert de gènes et études de biodistribution in vivo après administration systémique

Dans cette étude, de nouveaux lipophosphoramidates KLN47 formulés en présence de sondes lipidiques fluorescentes ont été synthétisés. Ses composés ont été caractérisés puis évalués sur lignées cellulaires et in vivo par bioluminescence et biofluorescence. En effet, la faible efficacité de transfection et l'élimination rapide des vecteurs synthétiques lors d'une administration systémique ainsi que les effets indésirables associés constituent des points limitants pour les systèmes de transfert de gènes non-viraux. Il est donc primordial de comprendre les facteurs qui influent sur la biodistribution, l'élimination et l'efficacité de transfection des vecteurs synthétiques afin d'adapter la structure chimique des formulations pour en accroître leurs efficacité. La caractérisation physicochimique des liposomes montre que les lipophosphoramidates fluorescents présentent une taille équivalente à celle du KLN47 non marqué, et une charge de surface positive. La présence de sondes lipidiques dans la solution liposomale ne modifie donc pas les propriétés physicochimiques du KLN47. Sur lignées cellulaires, nous avons montré que les nouvelles formulations étaient aussi efficaces que le KLN47, et peu toxiques. Grâce au marquage fluorescent et aux techniques d'imagerie in vivo, il a été montré, après injection systémique, une biodistribution principalement au niveau des poumons, supérieure en présence du DSPE-PEG₂₀₀₀. Ce signal s'étend également sur d'autres organes tels que les reins, le foie, la rate, le cœur...etc. Le suivi et la mesure de l'expression du gène rapporteur montre une émission du signal au niveau pulmonaire équivalente en présence et en absence du stabilisateur stérique DSPE-PEG₂₀₀₀. En absence du DSPE-PEG₂₀₀₀ une expression hépatique du transgène a également été observée. Parallèlement, nous avons évalué l'atteinte hépatique induite par nos molécules, par mesure des niveaux des enzymes hépatiques (AST et ALT) dans le sérum de souris. L'administration systémique de lipoplexes LF1C+DSPE-PEG₂₀₀₀/pGM144 entraîne une augmentation rapide mais transitoire de l'activité des transaminases, quelques heures après l'administration, atteignant un pic à 24 heures, suivie d'une récupération des valeurs de référence à 72 heures. Ainsi, l'administration systémique des lipoplexes LF1C+DSPE-PEG₂₀₀₀/pGM144 a entraîné une toxicité hépatique transitoire chez la souris. L'ensemble des résultats présentés dans l'article ci-après montrent que nous disposons d'outils intéressants pour les études de biodistribution in vivo. La voie IV permet de tester l'efficacité de transfection des cellules épithéliales pulmonaires assez rapidement, mais ne constitue pas une voie de référence dans le traitement de la mucoviscidose par thérapie génique. Ainsi, les perspectives consistent maintenant à évaluer la biodistribution et l'efficacité de ces molécules après aérosolisation, technique non invasive, permettant l'accès à la majorité des territoires pulmonaires.

Article

Evaluation of New Fluorescent Lipophosphoramidates for Gene Transfer and Biodistribution Studies after Systemic Administration

Nawal Belmadi¹, Mathieu Berchel^{2,3}, Caroline Denis^{1,2}, Wilfried Berthe^{2,3}, Yann Sibiril^{1,2}, Tony Le Gall^{1,2}, Jean-Pierre Haelters^{2,3}, Paul-Alain Jaffres^{2,3} and Tristan Montier^{1,2,4,*}

Received: 18 August 2015; Accepted: 16 October 2015; Published: 2 November 2015

Academic Editor: Gregor Drummen

¹ Unité INSERM 1078, Faculté de Médecine, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, 22 avenue Camille Desmoulins, 29238 Brest cedex 3, France; nawal.belmadi@univ-brest.fr (N.B.); caroline.denis@chu-brest.fr (C.D.); yann.sibiril@univ-brest.fr (Y.S.); tony.legall@univ-brest.fr (T.L.G.)

² Plateforme SynNanoVect, Biogenouest, SFR 148 ScInBioS, Université de Bretagne Occidentale, Faculté de Médecine, 22 rue Camille Desmoulins, 29238 Brest cedex 3, France; mathieu.berchel@univ-brest.fr (M.B.); wilfried.berthe@univ-brest.fr (W.B.); Jean-Pierre.Haelters@univ-brest.fr (J.-P.H.); paul-alain.jaffres@univ-brest.fr (P.-A.J.)

³ UMR CNRS 6521, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, Faculté des Sciences, 6 avenue Victor Le Gorgeu, 29238 Brest, France

⁴ Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité, CHRU de Brest, 5 Avenue du Maréchal Foch, 29609 Brest cedex, DUMC, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, 22 rue Camille Desmoulins, CS 93837-29238 Brest cedex 3, France

* Correspondence: tristan.montier@univ-brest.fr; Tel.: +33-0-2-9801-8080; Fax: +33-0-2-9846-7910

Abstract: The objective of lung gene therapy is to reach the respiratory epithelial cells in order to deliver a functional nucleic acid sequence. To improve the synthetic carrier's efficacy, knowledge of their biodistribution and elimination pathways, as well as cellular barriers faced, depending on the administration route, is necessary. Indeed, the *in vivo* fate guides the adaptation of their chemical structure and formulation to increase their transfection capacity while maintaining their tolerance. With this goal, lipidic fluorescent probes were synthesized and formulated with cationic lipophosphoramidate KLN47 (KLN: Karine Le Ny). We found that such formulations present constant compaction properties and similar transfection results without inducing additional cytotoxicity. Next, biodistribution profiles of pegylated and unpegylated lipoplexes were compared after systemic injection in mice. Pegylation of complexes led to a prolonged circulation in the bloodstream, whereas their *in vivo* bioluminescent expression profiles were similar. Moreover, systemic administration of pegylated lipoplexes resulted in a transient liver toxicity. These results indicate that these new fluorescent compounds could be added into lipoplexes in small amounts without perturbing the transfection capacities of the formulations. Such additional properties allow exploration of the *in vivo* biodistribution profiles of synthetic carriers as well as the expression intensity of the reporter gene.

Keywords: cationic lipids; administration way; *in situ* biodistribution; *in vivo* fluorescence; pegylated formulations

1. Introduction

As for any drug, the main role of nanocarriers is to provide a selective safe and efficient delivery. This allows the use of a small amount of active compound, thereby limiting the potential side effects of the drug. Tolerance is also dependent on a safe carrier elimination once the therapeutic molecule has been delivered. In order to develop effective non-viral gene transfer systems, biodistribution profiles should be investigated to better understand the *in situ* fate of these molecules and the biological barriers they have to overcome according to the route of administration. All these data are important to fine tune and design original chemical structures and optimal combinations between these different molecules. Among the present technologies, there exist some non-invasive tools such as bioluminescence and biofluorescence that can be used to track the tagged complexes while evaluating their transfection capacity [1]. Biofluorescence imaging (BFI) is a simple, low-cost and non-invasive technique. It can be carried out on living animals for different time periods, but it is important to note that the absorption and diffusion of the photons depend on the tissues depth, impacting observation [2,3]. In addition, an excitation source is needed, and can sometimes cause autofluorescence, phototoxicity or photobleaching phenomena [4]. Fluorescence technology also requires the use of fluorochromes such as cyanine, naphthalimide, NBD (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl), fluorescein and many others, that can be used alone or coupled to different compounds like synthetic carriers [5–9] or peptides [10]. Among non-viral vectors, cationic lipids are the most commonly used, and some are currently employed in gene therapy clinical trials [11–14].

Over the last decade, our laboratory has developed some original synthetic vectors and we investigated their potential as gene delivery systems. Thus, different cationic lipids such as lipophosphonates [15–17] and lipophosphoramidates [12,13,18–21] have been produced, and their high ability to transfect cells in culture and lungs mice were demonstrated [13,22–27]. However, the plasmid type [27–29], the vector [18,26,29–32] as well as the nucleic acids (NA) or synthetic carrier's labeling techniques [8,30,33–35], impact greatly the distribution in tissues as well as the transgene expression. Labeling liposomes with a fluorescent probe appears as a relevant procedure to establish biodistribution profiles of lipoplexes and their pharmacokinetics, irrespective of administration route [26,27,31–34,36–38]. In that sense, fluorescent lipophosphoramidates bearing a single fluorophore localized in the polar head domain were synthesized [8]. Indeed, the fluorophore (NBD, cyanine or naphthalimide) was coupled with a hydrophobic part that can be associated with other lipidic compounds. These neutral fluorescent compounds were thus included at a 5% molar ratio with a lipophosphoramidate (KLN47) to produce a fluorescent liposomal solution [8]. They were incorporated in small proportions to prevent perturbations of the supramolecular assembly as well as potential modifications of the transfection properties [8].

In the present study, we report the *in vivo* biodistribution profiles after systemic administration using new fluorescent lipophosphoramidate-based formulations. In parallel, to refine our understanding of the *in situ* fate of such complexes, we also monitored their effectiveness and tolerance. Liposomal formulations were first characterized by dynamic scattering and zeta potential measurements. Physicochemical results showed that resulting formulations exhibited a size in the same range as that obtained with the lipophosphoramidate KLN47 alone. Considering zeta potential measurements, all the formulations presented an equivalent positive charge. Additionally, fluorescent lipid (FL) did not modify the DNA complexation ability of the resulting complexes. In cell lines, their transfection abilities were quite similar. Considering *in vivo* studies, liposomes and lipoplexes formulated in the presence of DSPE-PEG₂₀₀₀ (1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-phosphoethanolamine-N-[Methoxy(Polyethyleneglycol)-2000] (Ammonium salt)) exhibited a superior bioavailability during the 24 h following the injection in comparison with their equivalent formulations without steric stabilizer. However, bioluminescence imaging (BLI) showed an equivalent luciferase expression in the lungs, regardless of the presence

or absence of DSPE-PEG₂₀₀₀. All together, the results indicate that these novel kinds of fluorescent compounds could be easily added to liposomal formulations to track lipoplexes *in vivo*.

2. Results and Discussion

2.1. Fluorescent Formulations

After synthesis, the fluorescent compounds were readily incorporated into the corresponding liposomal solutions without dramatic modifications of liposomes. The chemical lipid structures are represented in Figure 1. NMR, absorbance and fluorescence spectra are represented in Supplementary data (Scheme S1). All the formulations were then characterized depending on their size and zeta potential. The results showed that liposomes size was in the same range with those obtained with the reference KLN47 (Table 1), comprised between 104 and 290 nm, except for the formulations incorporating the naphthalimide dye that exhibits a diameter around 350 nm. The zeta potential measurements were clearly positive from +46 to +66 mV for all formulations. Nevertheless, the surface charge was slightly lower for the fluorescent formulations (+45 to +50 mV) whatever the fluorochrome in comparison with the KLN47 (~+60 mV). This difference of zeta potential could be explained by the presence of the neutral fluorescent lipid in the liposomal solution. Several concentrations were tested here; the less concentrated formulations KLN47_a (1.3 mg/mL) were designed for *in vitro* assessments while the most concentrated solutions KLN47_b (10 mg/mL) and KLN47_c (20 mg/mL) have been produced for animal applications. For *in vivo* assays, the formulations should be more concentrated in order to reduce the volume of formulations that are then administered, thereby limiting potential toxic effects. It is important to limit the injected volume, to avoid side effects and the immune response, and to facilitate the readministration of the formulations. Different comparisons were performed. Indeed, when KLN47_a was compared with FL1A (FL cyanine 5 mol %), we observed a diminution in particle size and zeta potential. Considering the highly concentrated solutions, KLN47_b compared with FL1B and KLN47_c with FL1C showed a reduction of the zeta potential as well as a decrease of the particles' size. In the end, adding such fluorescent lipid to KLN47 liposomal formulations appeared to slightly affect the chemical properties of the particle.

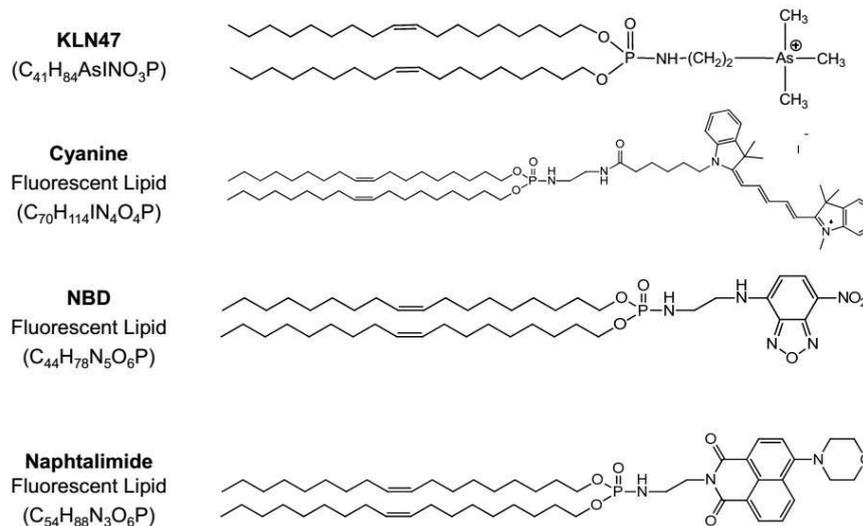


Figure 1. Chemical Structures of lipophosphoramidate KLN47 and fluorescent lipids.

Table 1. Chemical characteristics of fluorescent cationic lipids.

Formulations	Size (nm)	Poly Index	ζ Potential (mV)
KLN47 _a —1.5 mM, 1.3 mg/mL	220.9	-	+60.2
FL1A: KLN47 _a —1.5 mM + FL Cyanine 5 mol %	189	-	+44.0
FL2A: KLN47 _a —1.5 mM + FL NBD 5 mol %	167.5	0.561	+53.1
FL2B: KLN47 _a —1.5 mM + FL NBD 10 mol %	205.0	0.418	+43.0
FL3A: KLN47 _a —1.5 mM + FL Naphtalimide 5 mol %	353.0	0.668	+50.5
FL3B: KLN47 _a —1.5 mM + FL Naphtalimide 10 mol %	354.8	0.477	+56.2
KLN47 _b —11.5 mM, 10 mg/mL	234.8	0.560	+58.4
FL1B: KLN47 _b —11.5 mM + FL Cyanine 5 mol %	141.4	0.714	+48.1
KLN47 _c —23 mM, 20 mg/mL	286.8	0.792	+65.9
FL1C: KLN47 _c —23 mM + FL Cyanine 5 mol %	164.5	0.474	+54.4

2.2. In Vitro Evaluation

2.2.1. DNA Condensation Ability

Electrophoresis migration assays on agarose gel were achieved for each lipoplex at different charge ratios (CRs), respectively 1, 2, 4 and 8. This allowed the evaluation of the ability of all the formulations to condense and protect the plasmid DNA. As mentioned above, some complexes were designed for *in vitro* experiments such as KLN47_a, FL1A, FL2A, FL2B, FL3A and FL3B while the most concentrated, such as KLN47_b, KLN47_c, FL1B and FL1C were formulated for *in vivo* assays. First, ethidium bromide exclusion assays were performed to evaluate the ability of each formulation to condense plasmid DNA. Indeed, upon condensation ethidium bromide was expelled from DNA, and thus the fluorescence signal was decreased. Results showed that the different lipoplexes were able to condense the plasmid DNA with a high efficiency. The fluorescence signal rapidly decreased as the CR increased. To confirm the DNA condensation ability of each lipoplex, DNA retardation assays on agarose gel electrophoresis were next performed. Electrophoresis migration results showed that DNA condensation was partial at CR 1 and 2, and became complete at higher CRs. Globally, agarose gel retardation results (Figure 2) revealed a full condensation of pDNA at CR = 4 whatever the formulation. Thus, these lipids can efficiently complex as well as condense the pDNA. It is important to note here that the DNA condensation by the fluorescent formulation was similar to that of the KLN47. The results were in agreement with our previous reports [13,21,26]. To summarize, all formulations had an efficient DNA condensation ability at a CR of 2 or 4. The presence of a fluorescent particle did not affect the NA compaction properties of the formulations.

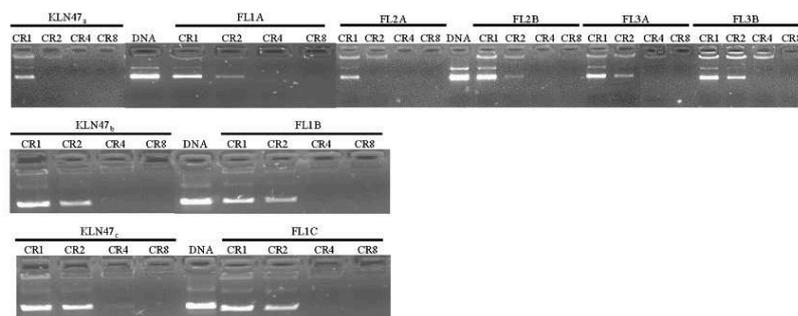


Figure 2. DNA binding ability of fluorescent compounds was evaluated in OptiMEM by mixing a constant mass of DNA (1 µg) with different concentrations of cationic lipids corresponding to different CRs. DNA full complexation was highlighted by the absence of DNA migration into the agarose gel, at a given CR depending on the formulations tested.

2.2.2. In Vitro Transfection Assays

With a view to lung gene delivery, we chose to use different cell lines (16HBE, A549 and HeLa) to evaluate the gene transfection efficiency of lipoplexes at different CRs (from 1 to 8). Agarose gel electrophoresis results suggested that the optimal condition for an efficient complexation was around CR 2 and 4. We first evaluated the reporter gene expression of the different formulations used in comparison with controls (KLN47, Lipofectamine 2000 (LFM), and naked DNA and untransfected cells). For lipofectamine 2000, the CRs have been calculated according to the manufactures recommendations. A constant mass of plasmid DNA (0.25 µg) was mixed with different concentrations of lipids (cationic lipids and lipofectamine) corresponding to the calculated CRs, whereas, the amount of lipid (cationic lipids and lipofectamine) was constant. Secondly, we assessed the impact of the CR and fluorescent probes on the transfection efficacy. The most concentrated formulations (FL1B and FL1C) were not evaluated *in vitro* because the cells died at such concentrations. Also, pegylated formulations were not tested *in vitro*, because the polyethylene glycol (PEG) was well known to reduce significantly the transfection efficiency [39]. Indeed, PEG hid the positive charges carried by the complexes, consequently reducing the electrostatic interactions between the complexes and their targeted cells. PEG is used to stabilize the complex *in vivo* and thereby reduce their early elimination. The efficient transfer of the gene of interest is ensured through cationic lipids. Regarding the transfection results represented in Figure 3, whatever the cell line, all formulations exhibited higher luciferase expression levels than the lipofectamine and naked pDNA. The fluorescent lipoplexes showed a transfection efficiency of the same magnitude when compared with KLN47 based complexes. The optimal transfection ability was obtained with a CR of 2, for all cell lines. These results were correlated to the pDNA retardation assays. The transfection efficiency was cell line dependent, and strongly decreased at CR = 8. For *in vitro* transfection efficiency and cytotoxicity, an ANOVA test was performed to evaluate the difference between formulations. All fluorescent compounds were compared to the lipophosphoramidate KLN47a used as a standard. Results showed that, concerning A549 cells, all formulations were effective for gene delivery at a CR of 2, with no significant difference with the KLN47a, except for FL3A (CR1) and FL3B (CR8). For HeLa cells, three compounds (FL2A, FL3A and FL3B) appears to be more effective than KLN47a, at CR = 4. FL2A was also more effective at a CR of 2 to transfect HeLa cells. Concerning 16HBE cells, two compounds (FL3A and FL3B) were identified as the most efficient carriers at a CR = 4. All together, these results indicated that the incorporation of these fluorescent compounds to lipophosphoramidate did not impact the transfection properties of the resulting KLN47-based formulations.

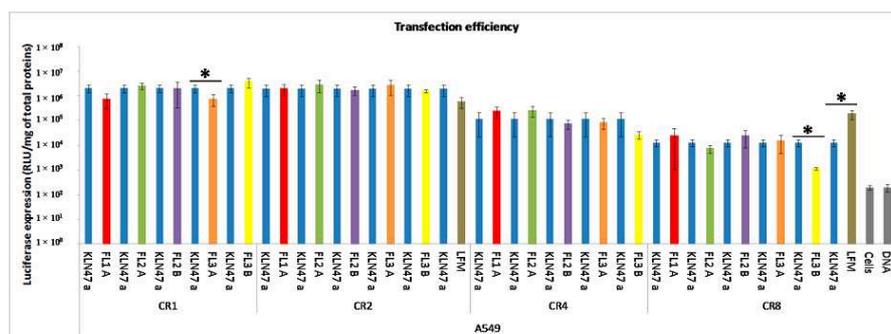


Figure 3. Cont.

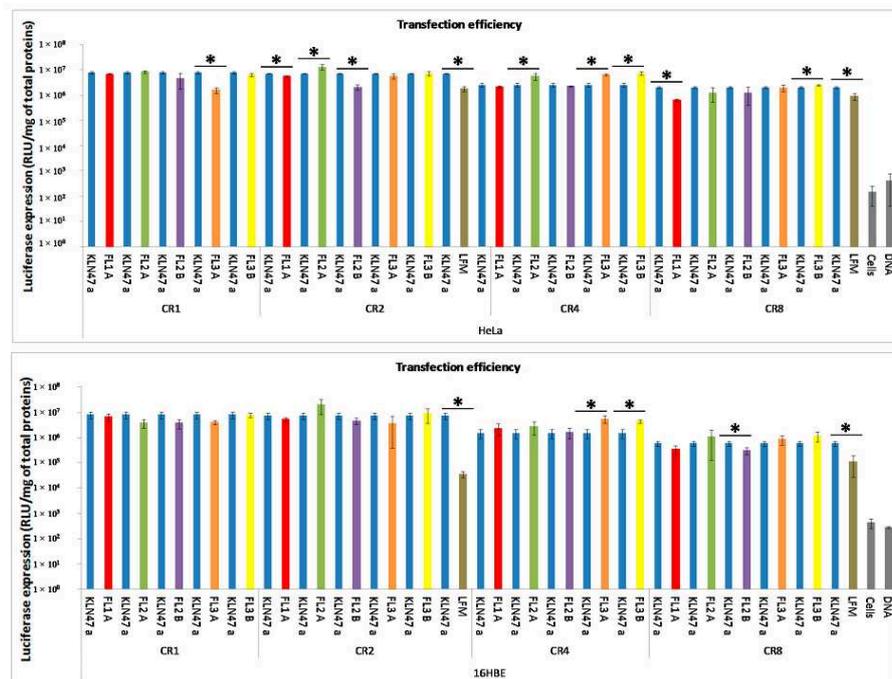


Figure 3. *In vitro* gene transfection efficiency of different formulations (CR ranging from one to eight) into cell lines A549, HeLa and 16HBE. The transfection procedure was performed as described in the experimental section. The luciferase expression was measured 48 hours after deposition of lipoplexes onto the cells. Results were expressed as Relative Light Units (RLU)/mg of total proteins obtained with each formulation, reflecting their transfection abilities as the mean \pm SD of three wells. Asterisk (*) indicates the significance difference of gene transfection efficiency between different formulations, as determined by an ANOVA test: * $p < 0.05$.

2.2.3. *In Vitro* Cytotoxicity

In parallel, cytotoxic effects induced by lipoplexes were also evaluated, through measurements of adenylate kinase (AK) released into the culture medium. The presence of this enzyme in the medium was an indicator of rapid membrane injury, revealing an early cytotoxicity. As showed in Figure 4, in comparison with untreated cells, no or slight cytotoxic effect was induced by the different lipoplexes. This early cellular toxicity appeared to be CR dependent. However, the basal AK intracellular concentration was specific to each cell type and the comparison between cell lines cannot be performed using this method. Globally, the comparison between the reference and the fluorescent based-lipoplexes revealed no additional toxicity and highlighted a high tolerance of the various formulations, except for few formulations. An ANOVA test was performed to compare the different formulations. Globally, at a low CR, all formulations were not toxic whatever the cell line. Indeed, the new fluorescent compounds presented a rate of adenylate kinase similar to that obtained with untreated cells. At high CRs (CR = 8) some toxic side effects were reported. The cytotoxicity was then dose-dependent. In A549, no toxic effect was reported in comparison with KLN47a. Concerning HeLa cells, at CR = 4, FL2A, FL3A and FL3B were slightly more toxic than KLN47a. It is also reported

that FL2A was a bit toxic for 16 HBE cells at a CR of 4 in comparison with a KLN47a. This low toxicity could be partially due to the presence of the fluorescent dyes into the liposomal solution.

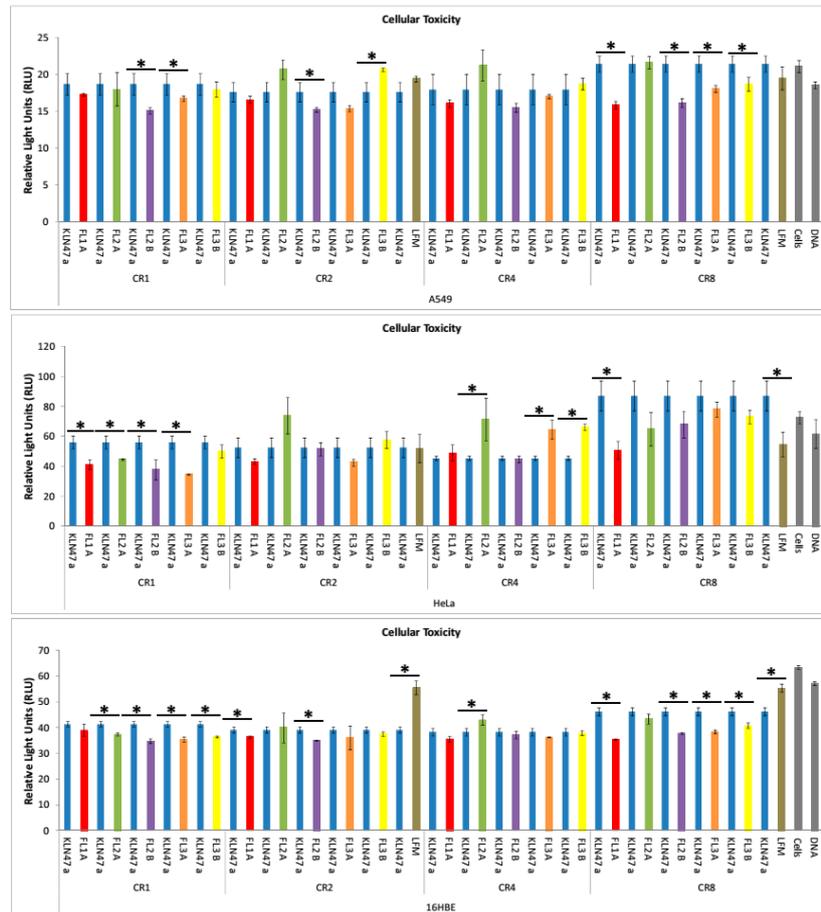


Figure 4. *In vitro* cytotoxicity evaluation of the different formulations into the three cell lines: A549, 16HBE and HeLa. The early cytotoxicity assessment was performed as described in experimental section, as specified by the manufacturer. The results were expressed as RLU obtained with each formulation, reflecting their cytotoxic effects as the mean \pm SD of 3 wells. Asterisk (*) indicates the significance difference of gene transfection efficiency between different formulations, as determined by an ANOVA test: * $p < 0.05$.

2.3. *In Vivo* Experiments

2.3.1. *In Vivo* Biodistribution

Considering *in vivo* biodistribution studies, we selected the FL1C formulation, containing high concentrated KLN47 thereby limiting the injected volume, and the cyanine dye for its compatibility with the *in vivo* imaging [40]. As previously shown, this formulation presented some interesting

biophysical characteristics in terms of size (164.5 nm) and potential zeta (+54 mV). To overcome the autofluorescence of bristles, we decided to work with nude mice fed with chlorophyll-free granules. We administered the FL1C based complexes via the systemic route (mouse tail vein), and we used *in vivo* biofluorescence and bioluminescence imaging, to localize, detect and quantify the transgene (luciferase) expression. Four conditions were tested (liposomes, liposomes + DSPE-PEG₂₀₀₀, lipoplexes, and lipoplexes + DSPE-PEG₂₀₀₀), with four mice per condition. BFI was performed at 1, 3, 5 and 24 h after systemic administration, in different positions for a better identification of the fluorescent sites. As mentioned above, the intensity of the fluorescence is dependent on the animal side in front of the CCD (Charged Coupled Device) camera. As the anchorage of PEG chains is known to enhance the *in vivo* circulation time of the complexes in the bloodstream [41,42], we chose to include DSPE-PEG₂₀₀₀ at a ratio of (DSPE-PEG₂₀₀₀/pDNA) of (1:1) in some formulations.

One hour after injection, a significant fluorescence signal was measured, as shown in Figure 5A, B. Whatever the position of the animal and during the 24 hours post-injection for a given formulation, the fluorescence intensity was in the same order of magnitude (Figure 5A). Mice receiving liposomes and lipoplexes stabilized with DSPE-PEG₂₀₀₀ showed a higher fluorescent signal than mice receiving unpegylated liposomes or lipoplexes (*p* value < 0.05) (Figure 5). This difference between pegylated and unpegylated complexes was significant whatever the position of animal or the acquisition time. This signal remained stable and detectable in all organs at 1, 3, and 5 hours, and tended towards a decrease at 24 h (Figure 5A,B). According to Figure 5B that illustrated the whole of observations, at 1 h, the signal was localized in the whole of mice principally in the sites corresponding to the lungs, heart, liver, spleen, kidneys and urinary system. At three and five hours post administration, the fluorescent signal was concentrated in the liver, kidneys and urinary tract. At 24 h post injection whatever the formulation, the fluorescent signal was principally detected in the kidneys and urinary system (Figure 5B). Considering the FL1C + DSPE-PEG₂₀₀₀/pGM144 particles, they were rapidly accumulated in the lungs, spleen, and liver. This accretion was maintained all along the experiment. Mice receiving FL1C/pGM144 showed approximately similar but lower fluorescent intensity than those with FL1C + DSPE-PEG₂₀₀₀/pGM144. The biodistribution results of pegylated liposomes and lipoplexes indicated a higher bioavailability in comparison with the unpegylated equivalent formulations. Additionally, pegylated liposomes tended to an increased systemic circulation time compared to the lipoplexes containing PEG. As expected, the surface coating with DSPE-PEG₂₀₀₀ chains promoted the bioavailability of complexes in the blood circulation [41–43]. Additionally, PEG modifications prevented complexes' aggregation, improving the stability of the formulations. Indeed, it was previously reported that pegylated complexes remained intact in the bloodstream up to three days compared to the unpegylated carriers [43]. Hydrophilic chains of PEG could avoid adsorption of the plasma proteins with the complexes by dysopsonization, limiting their degradation [37,43,44]. The PEG density on the surface of the complexes, as well as the PEG chains lengths constituted some important parameters that significantly impacted the surface properties of the particles, preventing the phagocytosis and leading to different distribution profiles [42,44,45]. The differences observed in term of fluorescence distribution after IV administration were the result of several effects, such as localization of dye into the nanocomplexes, dissociation kinetics of the complexes in the media and affinity between dyes and plasma proteins [46]. The gradual decrease of fluorescent signal was due to the elimination of the tagged compounds. Here the principal organs of elimination were the urinary tract (Figure 5B). We noticed that such fluorescent formulations were mainly eliminated after IV administration via the kidneys and not through the bilirubin pathway.

Int. J. Mol. Sci. **2015**, *16*, 26055–26076

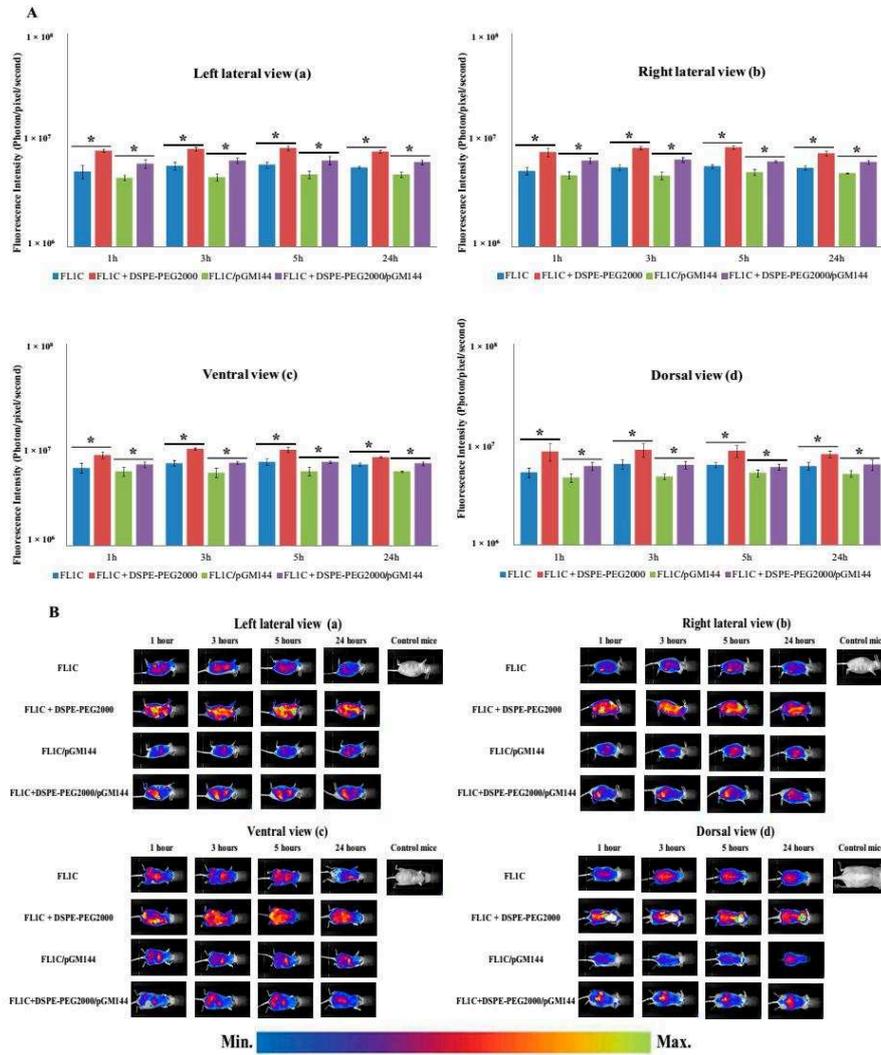


Figure 5. Cont.

26063

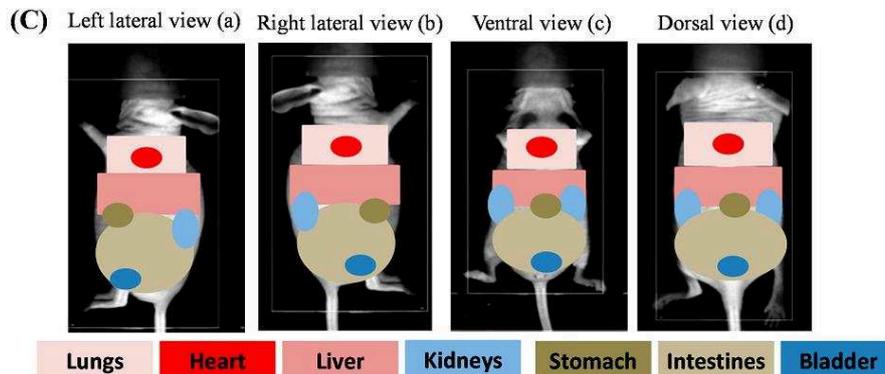


Figure 5. FLIC-based liposomes and lipoplexes biodistribution at different times (1, 3, 5 and 24 h). FL1C, FL1C + DSPE-PEG₂₀₀₀, FL1C/pGM144 and FL1C + DSPE-PEG₂₀₀₀/pGM144 were administered intravenously in nude mice ($n = 4$). BFI measurements and BFI images were taken in different positions (A,B); left lateral view (a), right lateral view (b), ventral view (c) and dorsal view (d) using the Nightowl II system (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) to localize all fluorescent organs, and global fluorescence intensity of FL1C-based complexes ($n = 4$) were compared (A). As an illustration, one mouse per experiment was represented in the different positions (B). In panel (C) was represented a schematic localization of several organs in each projection employed to clearly identify organs involved. Results were represented as photon/pixel/second reflecting the fluorescence intensity as the mean \pm SD of four mice ($* p < 0.05$). The sensitivity scale of the software Winlight 32 was blocked to allow the comparison of the profiles.

2.3.2. *In Vivo* Bioluminescence Imaging

The luciferase reporter gene expression was measured by BLI 24h post injection for both lipoplexes. BLI was a simple and sensitive imaging technique that permitted the monitoring of luciferase expression in real time in living animals. Contrary to BFI, BLI did not require any excitation light. This technique allowed the determination of whether the targeted cells were transfected or not [4]. The bioluminescent images (Figure 6A) clearly showed a luciferase expression into the lungs, for pegylated and unpegylated fluorescent lipoplexes. This observation confirmed that the addition of fluorescent molecules into the lipophosphoramidate-based formulations did not affect their transfection properties. The transgene was predominantly expressed in the lungs, whereas a part of the injected complexes was also trapped in the liver and the spleen [47–49]. This was in agreement with the BFI observations presented above. In fact, the largest particles remained definitively blocked in the pulmonary microcirculation [50], and through a micro embolism phenomenon, induced the passage from vessels to epithelial cells [51]. However, a slight luciferase activity was also detected in the liver, probably due to the complexes trapped in this organ (Figure 5B). It was also probable that lipoplexes aggregates contained some very small particles able to escape from the lung microcirculation and passively reach other organs such as liver or spleen. The transfection efficiency of fluorescent lipophosphoramidate KLN47-based formulations was similar to that previously obtained by Le Gall *et al.* [13]. This means that addition of fluorescent dyes to lipophosphoramidate KLN47 did not affect its transfection properties. Quantification of luciferase expression at 24 h after injection showed a mean expression of $2.5 \times 10^5 \pm 1.01 \times 10^5$ photon/second for lipoplexes containing DSPE-PEG₂₀₀₀ and $4.22 \times 10^5 \pm 7.13 \times 10^4$ photon/second for unpegylated formulations (Figure 6B). Statistically, no significant difference ($p = 0.09$) was reported between both conditions (pegylated and unpegylated complexes). Indeed, it was previously demonstrated that the leakage rate of drugs from pegylated complexes was more rapid than that from unpegylated

particles, which resulted in similar effects for both preparations [50]. The luciferase activity in lung tissue homogenates was very similar between pegylated and unpegylated formulations (data not shown). Thus, imaging with BLI and BFI were complementary. Indeed, BFI results informed about complex distribution, while the BLI data informed about the success of the transfection and the final transgene expression. However, we observed that while complexes could be located in an organ (BFI data), their physicochemical parameters, such as pegylation, and the nature of the tissue they were located in, could limit transfection capacities (BLI data). These observations were in agreement with previous reports established with other techniques [33,34].

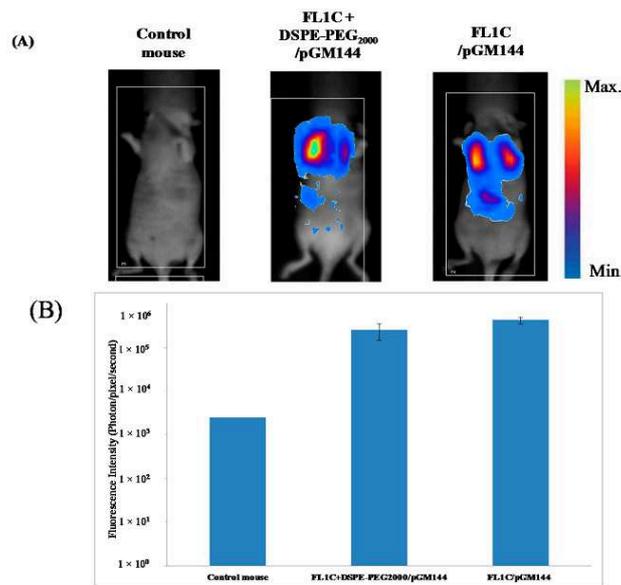


Figure 6. *In vivo* localization of luciferase (*luc*) expression reported at 24 h after intravenous delivery of FLIC-based lipoplexes (A); and Bioluminescence quantification (B). The acquisition of luminescence images was performed as described in experimental part, using the Nightowl II imaging system (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Data were expressed as photon/second reflecting the transfection efficiency of the different lipoplexes as mean ± SD ($n = 3$).

2.3.3. Biofluorescence Imaging in Isolated Organs

Twenty-four hours after the administration of the complexes, the animals were sacrificed by cervical dislocation and all their organs were collected for analysis. Fluorescent images in isolated organs were acquired as described in experimental section. Results showed clearly (Figure 7) that all organs were fluorescent at 24 h, principally the lungs and the liver (Figure 7). Mice receiving pegylated liposomes and lipoplexes showed a fluorescence accumulation principally in the lungs, the liver and to a lesser extent in the spleen. Indeed, complexes stabilized with DSPE-PEG₂₀₀₀ accumulated principally in the lungs (Figure 7) leading to risk of pulmonary embolism. In fact, particles presenting a larger size remained definitively blocked at alveolar capillaries. While the unpegylated complexes were essentially localized in the liver leading to their rapid elimination, the pegylation allowed escape from the first hepatic metabolism, prolonging the time that the particles resided in the blood circulation. These findings were confirmed by BFI images of isolated organs (Figure 7). ANOVA tests were performed to test the hypothesis of an existing difference between

pegylated and unpegylated complexes. Results indicate that pegylated lipoplexes accumulated significantly in the lungs ($p < 0.05$). While the unpegylated lipoplexes were principally localized in the liver. In fact, the pulmonary system of humans and animals is composed of thin capillaries with a diameter ranging from 2 to 13 μm . Thus, only the particles having a diameter less than 3 μm pass through the pulmonary microcirculation to be distributed to other tissues. Those with a larger diameter remain permanently blocked at pulmonary level, thereby generating a risk of pulmonary embolism. This lung accumulation leads to a predominantly pulmonary transgene expression. Indeed, upon systemic administration, a large portion of the injected particles was trapped in the liver due to the liver first-pass metabolism leading to reduced bioavailability in the blood circulation. When the complexes were pegylated, they escaped to the hepatic first-pass metabolism. Consequently, their residence time and bioavailability in the bloodstream were prolonged. Concerning the unpegylated liposomes they were principally accumulated in the heart in comparison with the liposomes containing PEG (Figure 7). Gjetting *et al.* have reported that addition of 10% PEG to lipoplexes caused a reduced retention in heart tissues of nude mice in comparison with unpegylated liposomes [39]. These observations were in accordance with our previous BFI imaging (Figure 5A,B), and confirmed the benefit of pegylation to enhance the *in vivo* bioavailability of complexes [30,42,44].

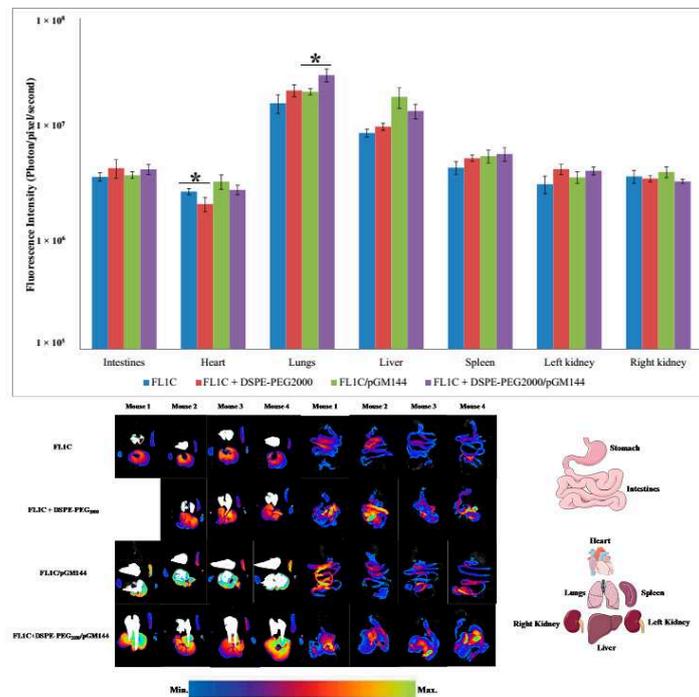


Figure 7. Biofluorescence of FLIC-based liposomes and lipoplexes from isolated organs after the systemic administration. Twenty-four hours post injection, mice were sacrificed by cervical dislocation and organs were collected for analysis. Fluorescence intensity was measured in different organs (lungs, liver, spleen, heart, intestines and kidneys). Results were expressed in photon/pixel/second obtained with each formulation reflecting the fluorescence intensity on different organs as mean \pm SD ($n = 4$). * $p < 0.05$.

2.3.4. *In Vivo* Hepatotoxicity

To assess the physiological impact of complexes, blood samples were collected at different times after administration (from 1 to 96 h). Then, the liver injury was evaluated through the measurements of hepatic enzymes (AST: aspartate transaminase and ALT: alanine transaminase) from mice serum. Results were expressed as International Units per Liter (IU/L). As shown in Figure 8, systemic administration of FL1C + DSPE-PEG₂₀₀₀-based lipoplexes resulted in a rapid but transient increase in the transaminase activities a few hours after injection, reaching a peak at 24 h. Transaminases recovered their reference values 72 h after injection. Thus, systemic administration of pegylated fluorescent lipoplexes resulted in a transient liver toxicity. This transient hepatotoxicity was largely reported in the literature [21,26,27,52–56]. The AST/ALT transitory increase obtained with FL1C + DSPE-PEG₂₀₀₀/pGM144 was similar to AST/ALT profile obtained with unpegylated formulations [26]. In this previous study, our histological data reported that unpegylated lipoplexes confirm the induced hepatotoxicity profile [26]. The same hepatotoxicity profile was also obtained with many other DNA nanocarriers after systemic administration [27,37]. We assumed that the fluorescent compounds did not induce some additional liver toxicity, because the level of AST/ALT was very similar between both studies.

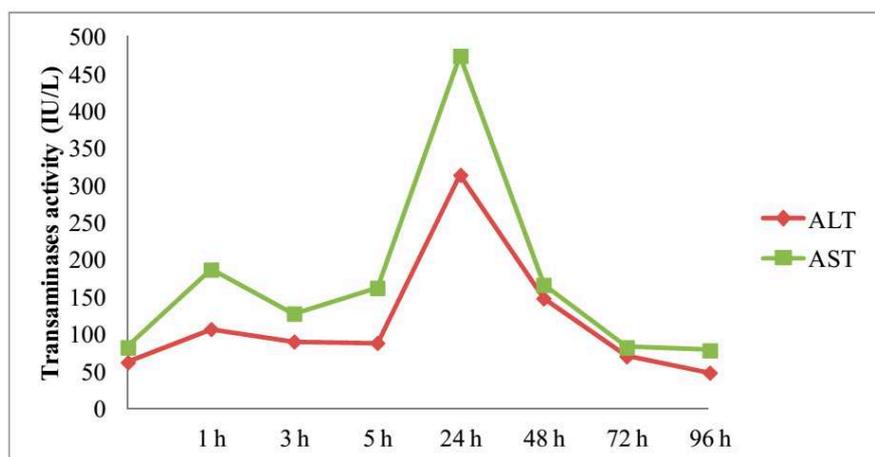


Figure 8. Kinetic of transaminase activities AST (green lines) and ALT (red lines) at different times following FL1C + DSPE-PEG₂₀₀₀/pGM144-based lipoplex administration. Results were based on one mouse per time, and expressed as IU/L.

3. Experimental Section

3.1. Formulation of Fluorescent Cationic Lipids

In this study, we designed a new fluorescent-labeled lipid derivative containing a fluorescent dye compatible with *in vivo* imaging. Cyanine dye, *i.e.*, Cy3 carboxylic acid, was chosen as a fluorescent probe that possessed a carboxylic acid group which can be functionalized under mild and efficient conditions. To ensure anchoring of the probe into the liposome and lipoplex formulations, we synthesized a lipophosphoramidate with a primary amine group in the polar head region. Synthesis of the cyanine probe was performed according to procedures previously described by Simmons *et al.* [57]. Synthesis of the lipid anchor was achieved in one step from di-*O,O*-oleylphosphite and ethylenediamine under Atherton Todd conditions as described previously in our laboratory [19]. Thereafter, coupling of the lipid part with the cyanine dye was performed as

peptide coupling reaction in the presence of EDC (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride) as coupling reagent in a DMF (*N,N*-dimethylformamide)/THF (Tetrahydrofuran) (3/2) mixture due to solubility concerns. The fluorescent-labeled lipophosphoramidate **3** was isolated after flash column chromatography and was fully characterized by NMR and mass spectrometry analysis.

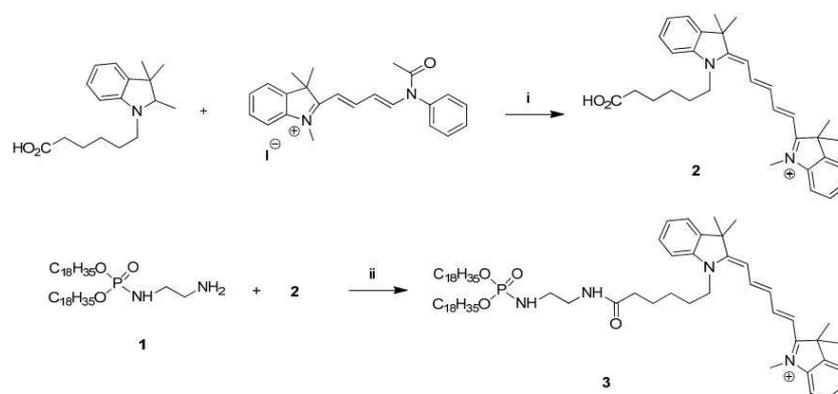
3.1.1. General Methods

Compounds **1** and **2** were prepared from procedures previously described. Solvents were dried with a solvent purification system MBraun-SPS (THF, CH₂Cl₂) or freshly distilled on appropriate driers (DIPEA (*N,N*-Diisopropylethylamine) was distilled over NaOH). All compounds were fully characterized by ¹H (500.13 or 400.133 or 300.135 MHz), ¹³C (125.773 or 75.480 MHz) and ³¹P (161.970 or 121.498 MHz) NMR spectroscopy (Bruker AC 300, Avance DRX 400 and Avance DRX 500 spectrometers). Coupling constants *J* are given in Hertz. The following abbreviations were used: s for singlet, d doublet, t triplet, q quadruplet, qt quintuplet, m for multiplet, dd for doublet of doublets and dt for doublet of triplets. When needed, ¹³C heteronuclear HMQC (Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation) and HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) were used to unambiguously establish molecular structures. Mass spectrometry analysis was performed by on a Bruker Autoflex MALDI TOF-TOF III LRF200 CID (Academic RMN-RPE-SM Facilities, UBO, Brest, France). Fluorescence measurements were conducted on a Cary Eclipse Varian spectrophotometer. Other commercial compounds were used as received.

Synthesis of compound **1**: Compound **1** was synthesized as previously described by Mével *et al.* [19].

Synthesis of compound **2**: Compound **2** was synthesized as previously described by Simmons *et al.* [57].

Synthesis of cyanine labeled lipophosphoramidate (Scheme 1). Compound **1** (100 mg, 0.16 mmol) and phosphoramidate **2** (105 mg, 0.16 mmol) were combined in a dry DMF/THF mixture (3/2, 5 mL) under nitrogen. EDC (35 mg, 0.18 mmol) was added and the reaction was stirred at room temperature overnight. The reaction was diluted with DCM (Dichloromethane) (30 mL), washed with water, dried over MgSO₄, filtered and concentrated. Column chromatography (DCM/MeOH 5%–10%) afforded the product as a dark blue solid (50 mg, 25% yield). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.89 (t, 3H), 1.21–1.35 (m, 44H), 1.54 (m, 4H), 1.58 (m, 4H), 1.68 (s, 12H), 1.78 (m, 4H), 1.97 (m, 8H), 3.14 (m, 2H), 3.38 (m, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.93 (m, 4H), 3.97 (m, 2H), 4.57 (m, 1H), 5.29 (m, 4H), 6.32 (d, 1H, *J* = 14 Hz), 6.65 (d, 1H, *J* = 14 Hz), 7.01 (t, 1H, *J* = 14.0 Hz), 7.06 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.17 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.21–7.25 (m, 4H), 7.31–7.39 (m, 4H), 7.82 (q, 2H), 8.61 (m, 1H). ³¹P NMR (400 MHz, CDCl₃): 10.5. ¹³C NMR (MHz, CDCl₃): 14.1, 22.7, 25.2–28.1, 28.2, 29.2–32.6, 36.2, 41.2, 41.6, 44.6, 49.0, 49.3, 66.5, 104.1, 104.6, 110.2, 110.9, 122.1, 125.0, 125.3, 127.0, 128.7, 129.7, 130.0–130.4, 140.7, 141.1, 141.9, 142.8, 152.6, 153.2, 172.6, 174.0. HRMS (Maldi-TOF) *m/z*: Calcd. for C₇₀H₁₁₄N₄O₄P: 1106.652 [M-H]⁺; Found: 1105.744.



Scheme 1. Synthesis of cyanine labeled lipophosphoramidate **3**. Reagents and conditions: i. Pyridine, 40 °C, 1.5 h; and ii. EDC, DMF/THF, RT, 18 h; Compound 1: O,Oioleoyl-N-ethylaminophosphoramidate, 2: 2-(5-(1-(5-Carboxypentyl)-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-2H-indol-2-ylidene)-1,3-pentadienyl)-1,3,3-trimethyl-3H-indolium.

3.1.2. Absorption

Five diluted solutions of the compounds were prepared by successive dilutions of a stock solution. Absorption spectra were measured in 1-cm quartz cuvettes on a Cary 50 spectrophotometer and corrected by the solvent background. The maximum absorption wavelength, λ_{\max} , was determined and the absorbance at this wavelength was plotted *versus* the molar concentration, c . Absorbance values were in the range 0.05 to 0.5. A calibration line was obtained for each compound, according to the Beer-Lambert law:

$$A = \epsilon_{\max} l c$$

The molar absorption coefficient at λ_{\max} , ϵ_{\max} , was calculated from the slope of the calibration line $A = f(c)$ graph, taking $l = 1$ cm.

3.1.3. Fluorescence

Fluorescence measurements were done on a Cary Eclipse Varian spectrofluorimeter (Agilent Technologies, Les Ulis, France) in 1-cm quartz cuvettes. An excitation-emission fluorescence matrix was first recorded in order to determine the main excitation-emission zone and also to check that only one fluorescent compound can be detected (the increment for excitation wavelength was 10 nm). Accurate excitation and emission spectra were then recorded (excitation and emission slits of 2.5 nm, slow scan) to determine excitation and emission maxima.

3.1.4. Liposomes

Liposomes and fluorescent liposomes were prepared following the lipid film hydration method. Briefly, cationic lipid (KLN47) alone or with fluorescent cyanine containing lipid (5 mol %) was dissolved in chloroform. Solvent was evaporated to dryness under vacuum at 40 °C and the lipid thin film was further dried for 4 h. The lipid film was hydrated with sterile water (final concentration = mM) and stored at 4 °C overnight. Several concentrations were obtained (1.5, 11.5 and 23 mM) for *in vitro* and *in vivo* assays (Table 1). The lipid suspension was vortexed and sonicated for 30 min and liposomes size and zeta potential were measured from an aliquot of 50 μ L after convenient dilution on a Malvern NanoZS apparatus (Malvern Instruments Ltd., Orsay, France).

3.2. *In Vitro* Experiments

3.2.1. Plasmid DNA

The plasmid pGM144 (3.7 Kb) kindly provided from UK Cystic Fibrosis Gene Therapy Consortium (London, UK), encodes for the firefly luciferase protein under the control of the human 1 α elongation factor (hCEF1 α) promoter associated with the human CMV enhancer, and a CpG-free form of the replication origin R6K. This plasmid is entirely CpG-free in order to remove or reduce the inflammatory response associated to the C=G dinucleotides presence [28,29]. After amplification in *Escherichia coli* GT115 strain, the plasmids were extracted and purified using the endotoxin-free plasmid DNA (pDNA) purification kits (Macherey Nagel, Hoerd, France) following the manufacturer's instructions. The DNA concentration was determined by spectrophotometry at 260 nm (Hitachi-Sciences & Technologies, Berkshire, UK). Only plasmids with an A_{260}/A_{280} ratio between 1.8 and 2 were used. The identity of the plasmid was confirmed by different enzymatic digestions followed by migration on 0.8% agarose gel.

3.2.2. DNA Condensation Ability

Before the evaluation of the transfection efficiency, the ability of the synthetic vectors to complex pDNA was checked. This allowed the determination of the CR for which the NA was totally complexed. CR was defined as the number of positive charges carried by the cationic lipid relative to the number of negative charges carried by the DNA phosphates. With this goal, 1 μ g of plasmid was mixed with corresponding cationic lipid to obtain CRs ranging from 1 to 8. All the formulations whatever their concentration, were evaluated. The complexes were prepared either in OptiMEM (Gibco, Villebon sur Yvette, France) for *in vitro* assays or in 0.9% NaCl for *in vivo* applications. The mixture was incubated for 1 hour at room temperature (RT). Then, 10 μ L of each complex was deposited on 0.8% agarose gel. DNA retardation was assessed by electrophoresis (100 V, 90 mA during 30 min). The gel was stained with ethidium bromide (10 mg/mL) and visualized on UV transilluminator (Fischer Bioblock, Illkirch-Graffenstaden, France).

3.2.3. *In Vitro* Transfection Assays

Preliminary tests were performed *in vitro* in order to evaluate the impact of the fluorescent probes on the KLN47-lipophosphoramidate formulations in term of transfection and toxicological impacts.

Cell Lines

In vitro assays were conducted on different epithelial cell lines: 16HBE (Human Bronchial Epithelial Cells), A549 (Adenocarcinoma Human Alveolar Basal Epithelial Cells CCL No. 2) and HeLa (Human Cervical Carcinoma CCL No. 185). A549 and HeLa cells were obtained from American-Type culture collection (Rockville, MD, USA). Considering the non-cancerous human bronchial epithelial cell line (16HBE), it was kindly provided by Dieter Gruenert (University of San Francisco, CA, USA) They were grown in EMEM (16HBE), or DMEM (A549 and HeLa), supplemented with 10% bovine fetal serum, 1% antibiotic and 1% L-Glutamine, in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C.

Transfection Procedure

Cells were seeded 24 h before transfection onto a 96-well plate, at a density of 25,000 cells per well, in 200 μ L of their specific medium and incubated overnight in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C. Each condition was tested in triplicate. Transfection was performed as following described. Various lipoplexes characterized by several CRs (1 to 8) were prepared with a constant amount of DNA plasmid (0.25 μ g) in OptiMEM medium (Gibco). Naked pDNA, untransfected cells and the commercial Lipofectamine 2000 (LFM, Invitrogen, Saint Aubin, France) were used as controls.

After 1 h of incubation at RT, 30 μ L of each lipoplex was added to the corresponding well. The plates were then incubated for 48 h until revelation.

Reporter Gene Expression

Forty-eight hours after transfection, cells were assayed for reporter gene expression using a chemiluminescent assay. After removing culture medium, 50 μ L of 0.5X Passive Lysis Buffer (PLB, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) were deposited in each well, and the plates were frozen at -20 °C. Then, plates were thawed at RT. After thawing, 25 μ L was taken from each well, and transferred to a white 96-well plate. The luciferase activity in the supernatant was quantified using a luminometer (MLX[®] Microtiter Plate Luminometer-Dynex, Guyancourt, Paris, France). The 25 μ L remaining in the starting plate was used to determine the protein concentration, using the photometric method with bicinchoninic acid (BCA protein assay reagent kit, Interchim, Montluçon, France). In parallel, a standard range of Bovine Serum Albumin (BSA, Interchim, Montluçon, France) was performed to associate each absorbance value measured with a protein concentration. Two hundred μ L of reconstituted reagent was added to each well, and then the plates were incubated at 37 °C for 30 min. The protein concentration in each well was then measured at 540 nm (spectrophotometer ELx808[™], BioTek Instruments, Fisher Scientific, Illkirch, France). The data were expressed as RLU per mg of total protein (RLU/mg of total proteins).

Cytotoxicity Assessment

Evaluation of cytotoxicity was performed using the Toxilight Bioassay kit (Lonza, Verviers, Belgique). This kit was based on the activity of AK that was normally present exclusively in the cytoplasm. Cell membrane alterations resulted in the release of AK enzyme in the culture medium, revealing the cytotoxicity induced by the formulations. Two hours after the deposit of complexes onto the cells, 20 μ L of supernatant was collected per well, to estimate the early cytotoxicity. This assay was carried out, as specified by the manufacturer, and the results were expressed as RLU. The RLU were conversely proportional to the intensity of damages induced to the cells. Untransfected cells were used to evaluate the AK standard level and were considered as the reference in term of toxicity.

3.3. *In Vivo* Experiments

3.3.1. *In Vivo* Systemic Administration

In vivo biodistribution assays were conducted with female NMRI nude mice of 6 weeks (JANVIER Rodent research models & associated services LABS, Saint Berthevin, France). This project was approved by the ethic committee of Finistère No: 74 and registered under the reference 00567.01., from 26 May 2014 to 21 July 2014. High concentrated FL1C formulation was used for *in vivo* applications. Such formulation permitted to inject a low volume of compounds. Mice were housed and maintained at the university animal facility; they were processed in accordance with the Laboratory Animal Care Guidelines and with the agreement of the regional veterinary service. It was previously demonstrated that CR = 4 was generally efficient both *in vitro* and *in vivo* assays [13,26]. Then, appropriate quantities of pGM144 and FL1C were mixed and 200 μ L was injected to each mouse at CR of 4 containing 50 μ g of pDNA, in presence or absence of DSPE-PEG₂₀₀₀ (Avanti[®] Polar Lipids, Inc. COGER, Paris, France). We used DSPE-PEG₂₀₀₀ in order to protect and to enhance the circulation time of complexes [42]. FL1C based lipoplexes or liposomes \pm DSPE-PEG₂₀₀₀ were prepared in 0.9% NaCl for *in vivo* assays. After 1 hour of incubation at RT, 200 μ L of complexes was injected via the tail vein to each mouse.

3.3.2. *In Vivo* Biofluorescence Imaging

Non-invasive BFI was performed successively at 1, 3, 5 and 24 h post injection, using the BFI system of the Nightowl II (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). This system was

equipped with a cooled, slow-scan CCD camera and driven with the Winlight32 software (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Considering the fluorescent characteristics of cyanine, we selected the 630 nm excitation and 655 nm emission filters. BFI images were taken onto different positions to obtain general view of fluorescence distribution.

The animals were previously anesthetized with a 4% air-isoflurane blend. They were maintained anesthetized with a 2% air-isoflurane mixture all along the acquisition, in the acquisition chamber (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). The fluorescent acquisition time was 1 second and the fluorescent signal was then overlaid on a picture of corresponding mouse. Results were expressed as photon/pixel/second.

3.3.3. *In Vivo* Bioluminescence Imaging

In order to evaluate the transfection efficiency of the fluorescent cationic lipid, non-invasive BLI was performed 24 h post-injection of lipoplexes, using the *luc* reporter gene system. First, mice received by intraperitoneal injection 200 μ L of luciferin (20 mg/mL in 20 mM Hepes buffer; Luciferins, FluoProbesR, Interchim, Montluçon, France). Then, they were anesthetized as previously described. Luminescence images were performed using the Nightowl II imaging system (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) associated with the WinLight 32 software (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany), with a binning of 8×8 and an exposure time of 4 min. Luminescence images were then overlaid onto images of each corresponding mouse. The luminescence intensities were quantified as photon/second.

3.3.4. Biofluorescence Imaging in Isolated Organs

Twenty-four hours after complex administration, the animals were sacrificed by cervical dislocation and all their organs were collected for fluorescence analysis. Fluorescent images in isolated organs were acquired as previously described for the whole animal, and results were presented in photon/pixel/second.

3.3.5. *In vivo* Hepatotoxicity Assessment

To assess the physiological impact of administered complexes, blood samples were collected from each mouse at different times post administration (from 1 to 96 h). Around 100 to 200 μ L were collected from the saphenous vein of treated mice on a heparin tube. Then, tubes were centrifuged at 10,000 g for 2 min at 4 °C and blood plasma were collected to measure ALT and AST levels, using a commercial kit (Elitech, Puteaux, France) and according to the provider recommendations. This method was based on the absorbance kinetic at 340 nm corresponding to the oxidation of NADH into NAD when transaminases were in contact with their substrates. Results were expressed as International Units per Liter (IU/L).

3.4. Statistical Test

The Student *t*-Test and ANOVA test were used to statistically compare the transfection efficiency of pegylated and unpegylated complexes. A *p* value of less than 0.05 was considered significant.

4. Conclusion

The study presented here explored the biodistribution profiles of new lipidic fluorescent complexes following IV administration in nude mice. Data showed that labelling lipophosphoramidates with fluorescent probes did not affect their properties in terms of gene delivery ability and tolerance. Results highlighted the potential of these molecules as tracers of lipophosphoramidate-based liposomes or lipoplexes to investigate *in situ* biodistribution of the particles as well as cell trafficking. This work demonstrated also the duality of the pegylation, providing a high bioavailability, but limiting transfection capacity. Such multimodular synthetic

Int. J. Mol. Sci. **2015**, *16*, 26055–26076

systems could be used to guide the formulation of complexes and some new fluorescent compounds will be explored in the near future [35] using FRET (Förster Resonance Energy Transfer) activity.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/11/25941/s1>.

Acknowledgments: Nawal Belmadi was recipient of a doctoral fellowship from “Conseil Régional de Bretagne” and “Université de Bretagne Occidentale”. This work was supported by grants from “Association Française contre les myopathies” (AFM, Evry, France), “Vaincre la Mucoviscidose” (VLM, Paris, France), “Association française de transfusion sanguine et de biogénétique Gaëtan Saleün” (Brest, France), INSERM and SFR148ScnBios (Brest, France).

Author Contributions: Nawal Belmadi performed all experiments of the study; Nawal Belmadi and Tristan Montier analyzed all results and wrote the paper; Mathieu Berchel, Wilfried Berthe, Jean-Pierre Haelters and Paul-Alain Jaffres synthesized and formulated the different cationic lipids; and Yann Sibiril, Caroline Denis and Tony Le Gall participated in the experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AK: Adenylate kinase; ALT: Alanine Transaminase; AST: Aspartate Transaminase; BFI: BioFluorescence Imaging; BLI: Bioluminescence Imaging; CR: Charge Ratio; DCM: Dichloromethane; DIPEA: *N,N*-Diisopropylethylamine; DMF: *N,N*-dimethylformamide; DSPE-PEG₂₀₀₀: 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[Methoxy(Polyethyleneglycol)-2000] (Ammonium salt); EDC: *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride; FL: Fluorescent Lipid; HMBC: Heteronuclear Multiple-Bond Correlation; HMQC: Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation; IV: Intravenous injection; LFM: Lipofectamine; MeOH: Methanol; NA: Nucleic Acids, NBD: 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl; PEG: PolyEthylene Glycol; RLU: Relative Light Units; and RT: Room Temperature, and THF: Tetrahydrofuran.

References

1. Baker, M. Whole-animal imaging: The whole picture. *Nature* **2010**, *463*, 977–980. [CrossRef] [PubMed]
2. Goutayer, M.; Dufort, S.; Jossierand, V.; Royère, A.; Heinrich, E.; Vinet, F.; Bibette, J.; Coll, J.-L.; Texier, I. Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: Assessment by *in vivo* fluorescence imaging. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *75*, 137–147. [CrossRef] [PubMed]
3. David, S.; Carmoy, N.; Resnier, P.; Denis, C.; Misery, L.; Pitard, B.; Benoit, J.-P.; Passirani, C.; Montier, T. *In vivo* imaging of DNA lipid nanocapsules after systemic administration in a melanoma mouse model. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423*, 108–115. [CrossRef] [PubMed]
4. Takai, A.; Nakano, M.; Saito, K.; Haruno, R.; Watanabe, T.M.; Ohyanagi, T.; Jin, T.; Okada, Y.; Nagai, T. Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 4352–4356. [CrossRef] [PubMed]
5. Trupp, S.; Schweitzer, A.; Mohr, G.J. A fluorescent water-soluble naphthalimide-based receptor for saccharides with highest sensitivity in the physiological pH range. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2965. [CrossRef] [PubMed]
6. Black, S.L.; Stanley, W.A.; Filipp, F.V.; Bhairo, M.; Verma, A.; Wichmann, O.; Sattler, M.; Wilmanns, M.; Schultz, C. Probing lipid- and drug-binding domains with fluorescent dyes. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1162–1173. [CrossRef] [PubMed]
7. Wichmann, O.; Gelb, M.H.; Schultz, C. Probing phospholipase A₂ with fluorescent phospholipid substrates. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1555–1569. [CrossRef] [PubMed]
8. Berchel, M.; Haelters, J.-P.; Couthon-Gourvès, H.; Deschamps, L.; Midoux, P.; Lehn, P.; Jaffrès, P.-A. Modular Construction of fluorescent lipophosphoramidates by click chemistry. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 6294–6303. [CrossRef]
9. Lamarche, F.; Mével, M.; Montier, T.; Burel-Deschamps, L.; Giamarchi, P.; Tripier, R.; Delépine, P.; le Gall, T.; Cartier, D.; Lehn, P.; Jaffrès, P.-A.; *et al.* Lipophosphoramidates as lipidic part of lipospermines for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1575–1582. [CrossRef] [PubMed]

10. Mohd Mustapa, M.F.; Bell, P.C.; Hurley, C.A.; Nicol, A.; Guénin, E.; Sarkar, S.; Writer, M.J.; Barker, S.E.; Wong, J.B.; Pilkington-Miksa, M.A.; *et al.* Biophysical characterization of an integrin-targeted lipopolyplex gene delivery vector. *Biochemistry* **2007**, *46*, 12930–12944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Zhang, X.-X.; McIntosh, T.J.; Grinstaff, M.W. Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery. *Biochimie* **2012**, *94*, 42–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Montier, T.; Benvegno, T.; Jaffrès, P.-A.; Yaouanc, J.-J.; Lehn, P. Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: A series of bio-inspired lipids as an example. *Curr. Gene Ther.* **2008**, *8*, 296–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Le Gall, T.; Loizeau, D.; Picquet, E.; Carmoy, N.; Yaouanc, J.-J.; Burel-Deschamps, L.; Delépine, P.; Giamarchi, P.; Jaffrès, P.-A.; Lehn, P.; *et al.* A novel cationic lipophosphoramidate with diunsaturated lipid chains: Synthesis, physicochemical properties, and transfection activities. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1496–1508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Alton, E.W.F.W.; Armstrong, D.K.; Ashby, D.; Bayfield, K.J.; Bilton, D.; Bloomfield, E.V.; Boyd, A.C.; Brand, J.; Buchan, R.; Calcedo, R.; *et al.* Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir. Med.* **2015**, *3*, 684–691. [[CrossRef](#)]
15. Guénin, E.; Hervé, A.-C.; Floch, V.; Loisel, S.; Yaouanc, J.-J.; Clément, J.-C.; Férec, C.; des Abbayes, H. Cationic phosphonolipids containing quaternary phosphonium and arsonium groups for DNA transfection with good efficiency and low cellular toxicity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 629–631. [[CrossRef](#)]
16. Floch, V.; Delépine, P.; Guillaume, C.; Loisel, S.; Chassé, S.; le Bolc'h, G.; Gobin, E.; Leroy, J.P.; Férec, C. Systemic administration of cationic phosphonolipids/DNA complexes and the relationship between formulation and lung transfection efficiency. *BBA Biomembr.* **2000**, *1464*, 95–103. [[CrossRef](#)]
17. Laurent, V.; Fraix, A.; Montier, T.; Cammas-Marion, S.; Ribault, C.; Benvegno, T.; Jaffrès, P.-A.; Loyer, P. Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells: New means for drug metabolism and toxicity studies. *Biotechnol. J.* **2010**, *5*, 314–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Berchel, M.; Le Gall, T.; Couthon-Gourvès, H.; Haelters, J.-P.; Montier, T.; Midoux, P.; Lehn, P.; Jaffrès, P.-A. Lipophosphonate/lipophosphoramidates: A family of synthetic vectors efficient for gene delivery. *Biochimie* **2012**, *94*, 33–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Mével, M.; Breuzard, G.; Yaouanc, J.-J.; Clément, J.-C.; Lehn, P.; Pichon, C.; Jaffrès, P.-A.; Midoux, P. Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate lipids: High efficiency of an imidazolium derivative. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1462–1471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Le Corre, S.S.; Berchel, M.; Belmadi, N.; Denis, C.; Haelters, J.-P.; Le Gall, T.; Lehn, P.; Montier, T.; Jaffrès, P.-A. Cationic lipophosphoramidates with two different lipid chains: Synthesis and evaluation as gene carriers. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 1463–1474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Berchel, M.; Le Gall, T.; Haelters, J.-P.; Lehn, P.; Montier, T.; Jaffrès, P.-A. Cationic lipophosphoramidates containing a hydroxylated polar headgroup for improving gene delivery. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 1902–1910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Song, Y.K.; Liu, F.; Chu, S.; Liu, D. Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer *in vivo* by intravenous administration. *Hum. Gene Ther.* **1997**, *8*, 1585–1594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Orson, F.M.; Song, L.; Gautam, A.; Densmore, C.L.; Bhogal, B.S.; Kinsey, B.M. Gene delivery to the lung using protein/polyethylenimine/plasmid complexes. *Gene Ther.* **2002**, *9*, 463–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Navarro, G.; Maiwald, G.; Haase, R.; Rogach, A.L.; Wagner, E.; de Ilarduya, C.T.; Ogris, M. Low generation PAMAM dendrimer and CpG free plasmids allow targeted and extended transgene expression in tumors after systemic delivery. *J. Control. Release* **2010**, *146*, 99–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hattori, Y.; Nakamura, A.; Arai, S.; Kawano, K.; Maitani, Y.; Yonemochi, E. siRNA delivery to lung-metastasized tumor by systemic injection with cationic liposomes. *J. Liposome Res.* **2014**, *4*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lindberg, M.F.; Carmoy, N.; Le Gall, T.; Fraix, A.; Berchel, M.; Lorilleux, C.; Couthon-Gourvès, H.; Bellaud, P.; Fautrel, A.; Jaffrès, P.-A.; Lehn, P.; Montier, T. The gene transfection properties of a lipophosphoramidate derivative with two phytanyl chains. *Biomaterials* **2012**, *33*, 6240–6253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Lindberg, M.F.; Le Gall, T.; Carmoy, N.; Berchel, M.; Hyde, S.C.; Gill, D.R.; Jaffrès, P.-A.; Lehn, P.; Montier, T. Efficient *in vivo* transfection and safety profile of a CpG-free and codon optimized luciferase plasmid using a cationic lipophosphoramidate in a multiple intravenous administration procedure. *Biomaterials* **2015**, *59*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Hyde, S.C.; Pringle, I.A.; Abdullah, S.; Lawton, A.E.; Davies, L.A.; Varathalingam, A.; Nunez-Alonso, G.; Green, A.-M.; Bazzani, R.P.; Sumner-Jones, S.G.; *et al.* CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 549–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Davies, L.A.; Hyde, S.C.; Nunez-Alonso, G.; Bazzani, R.P.; Harding-Smith, R.; Pringle, I.A.; Lawton, A.E.; Abdullah, S.; Roberts, T.C.; McCormick, D.; *et al.* The use of CpG-free plasmids to mediate persistent gene expression following repeated aerosol delivery of pDNA/PEI complexes. *Biomaterials* **2012**, *33*, 5618–5627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Belmadi, N.; Midoux, P.; Loyer, P.; Passirani, C.; Pichon, C.; le Gall, T.; Jaffrès, P.-A.; Lehn, P. Tristan Montier Synthetic vectors for gene delivery: An overview of their evolution depending on routes of administration. *Biotechnol. J.* **2015**, *10*, 1370–1389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Midoux, P.; Pichon, C.; Yaouanc, J.-J.; Jaffrès, P.-A. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers: Histidine-rich nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 166–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. McLachlan, G.; Davidson, H.; Holder, E.; Davies, L.A.; Pringle, I.A.; Sumner-Jones, S.G.; Baker, A.; Tennant, P.; Gordon, C.; Vrettou, C.; *et al.* Pre-clinical evaluation of three non-viral gene transfer agents for cystic fibrosis after aerosol delivery to the ovine lung. *Gene Ther.* **2011**, *18*, 996–1005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Delépine, P.; Guillaume, C.; Montier, T.; Clément, J.C.; Yaouanc, J.J.; Des Abbayes, H.; Berthou, F.; le Pape, A.; Ferec, C. Biodistribution study of phosphonolipids: A class of non-viral vectors efficient in mice lung-directed gene transfer. *J. Gene Med.* **2003**, *5*, 600–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Osaka, G.; Carey, K.; Cuthbertson, A.; Godowski, P.; Patapoff, T.; Ryan, A.; Gadek, T.; Mordenti, J. Pharmacokinetics, tissue distribution, and expression efficiency of plasmid [³³P]DNA following intravenous administration of DNA/Cationic lipid complexes in mice: Use of a novel radionuclide approach. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 612–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Berchel, M.; Haelters, J.-P.; Afonso, D.; Maroto, A.; Deschamps, L.; Giamarchi, P.; Jaffrès, P.-A. Functionalized phospholipid molecular platform: use for production of cationic fluorescent lipids: Phospholipid molecular platform for cationic fluorescent lipids. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 1076–1083. [[CrossRef](#)]
36. Davies, L.A.; McLachlan, G.; Sumner-Jones, S.G.; Ferguson, D.; Baker, A.; Tennant, P.; Gordon, C.; Vrettou, C.; Baker, E.; Zhu, J.; *et al.* Enhanced Lung Gene Expression After Aerosol Delivery of Concentrated pDNA/PEI Complexes. *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 1283–1290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. David, S.; Passirani, C.; Carmoy, N.; Morille, M.; Mevel, M.; Chatin, B.; Benoit, J.-P.; Montier, T.; Pitard, B. DNA nanocarriers for systemic administration: characterization and *in vivo* bioimaging in healthy mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2013**, *2*, e64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Woods, A.; Patel, A.; Spina, D.; Riffo-Vasquez, Y.; Babin-Morgan, A.; de Rosales, R.T.M.; Sunassee, K.; Clark, S.; Collins, H.; Bruce, K.; *et al.* *In vivo* biocompatibility, clearance, and biodistribution of albumin vehicles for pulmonary drug delivery. *J. Control. Release* **2015**, *210*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Gjetting, T.; Arildsen, N.S.; Christensen, C.L.; Poulsen, T.T.; Roth, J.A.; Handlos, V.N.; Poulsen, H.S. *In vitro* and *in vivo* effects of polyethylene glycol (PEG)-modified lipid in DOTAP/cholesterol-mediated gene transfection. *Int. J. Nanomed.* **2010**, *5*, 371–383.
40. Le Guennic, B.; Jacquemin, D. Taking up the cyanine challenge with quantum tools. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 530–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Mosqueira, V.C.F.; Legrand, P.; Gulik, A.; Bourdon, O.; Gref, R.; Labarre, D.; Barratt, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials* **2001**, *22*, 2967–2979. [[CrossRef](#)]
42. Morille, M.; Montier, T.; Legras, P.; Carmoy, N.; Brodin, P.; Pitard, B.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting. *Biomaterials* **2010**, *31*, 321–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

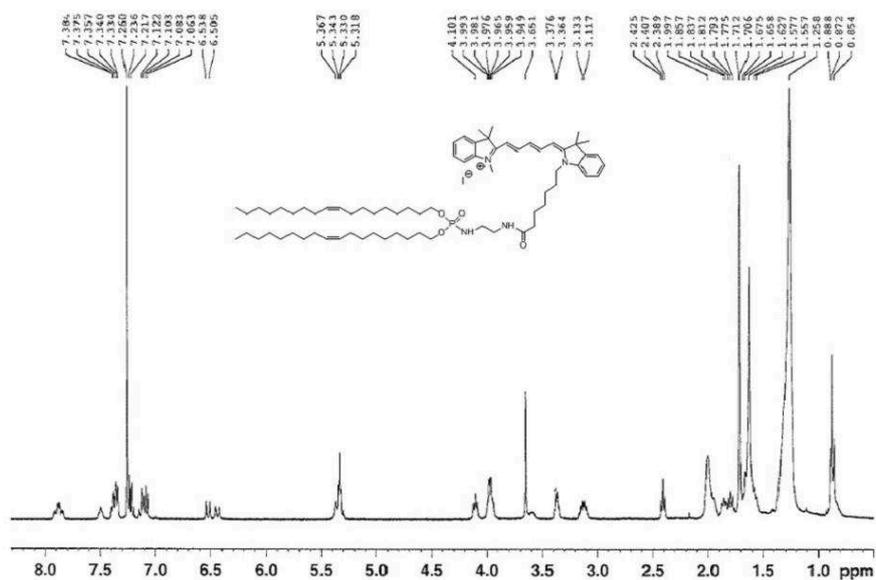
43. Bikram, M.; Lee, M.; Chang, C.-W.; Janát-Amsbury, M.-M.; Kern, S.E.; Kim, S.W. Long-circulating DNA-complexed biodegradable multiblock copolymers for gene delivery: Degradation profiles and evidence of dysopsonization. *J. Control. Release* **2005**, *103*, 221–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L.K.; Farokhzad, O.C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 505–515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hirsjärvi, S.; Dufort, S.; Gravier, J.; Texier, I.; Yan, Q.; Bibette, J.; Sancey, L.; Josserand, V.; Passirani, C.; Benoit, J.-P.; *et al.* Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the *in vitro* reactivity and *in vivo* biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, *9*, 375–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Mérian, J.; Boisgard, R.; Bayle, P.-A.; Bardet, M.; Tavitian, B.; Texier, I. Comparative biodistribution in mice of cyanine dyes loaded in lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *93*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Liggitt, D. Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24864–24870.
48. Zhu, N.; Liggitt, D.; Liu, Y.; Debs, R. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* **1993**, *261*, 209–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Thierry, A.R.; Lunardi-Iskandar, Y.; Bryant, J.L.; Rabinovich, P.; Gallo, R.C.; Mahan, L.C. Systemic gene therapy: Biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9742–9746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kutscher, H.L.; Chao, P.; Deshmukh, M.; Singh, Y.; Hu, P.; Joseph, L.B.; Reimer, D.C.; Stein, S.; Laskin, D.L.; Sinko, P.J. Threshold size for optimal passive pulmonary targeting and retention of rigid microparticles in rats. *J. Control. Release* **2010**, *143*, 31–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Ogris, M.; Brunner, S.; Schuller, S.; Kircheis, R.; Wagner, E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: Reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* **1999**, *6*, 595–605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Le Gall, T.; Barbeau, J.; Barrier, S.; Berchel, M.; Lemiègre, L.; Jeftić, J.; Meriadec, C.; Artzner, F.; Gill, D.R.; Hyde, S.C.; *et al.* Effects of a novel archaeal tetraether-based colipid on the *in vivo* gene transfer activity of two cationic amphiphiles. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 2973–2988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Loisel, S.; Le Gall, C.; Doucet, L.; Ferec, C.; Floch, V. Contribution of plasmid DNA to hepatotoxicity after systemic administration of lipoplexes. *Hum. Gene Ther.* **2001**, *12*, 685–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ito, Y.; Kawakami, S.; Charoensit, P.; Higuchi, Y.; Hashida, M. Evaluation of proinflammatory cytokine production and liver injury induced by plasmid DNA/cationic liposome complexes with various mixing ratios in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 303–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kako, K.; Nishikawa, M.; Yoshida, H.; Takakura, Y. Effects of inflammatory response on *in vivo* transgene expression by plasmid DNA in mice. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 3074–3083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kawakami, S.; Ito, Y.; Fumoto, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. Enhanced gene expression in lung by a stabilized lipoplex using sodium chloride for complex formation. *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 1526–1533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Simmons, R.L.; Yu, R.T.; Myers, A.G. Storable arylpalladium(II) reagents for alkene labeling in aqueous media. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15870–15873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



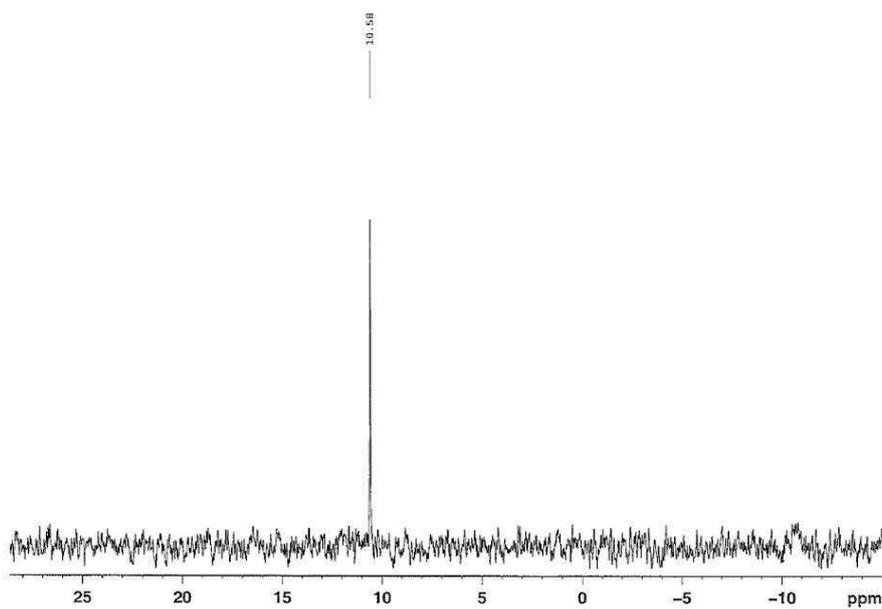
© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Supplementary Information

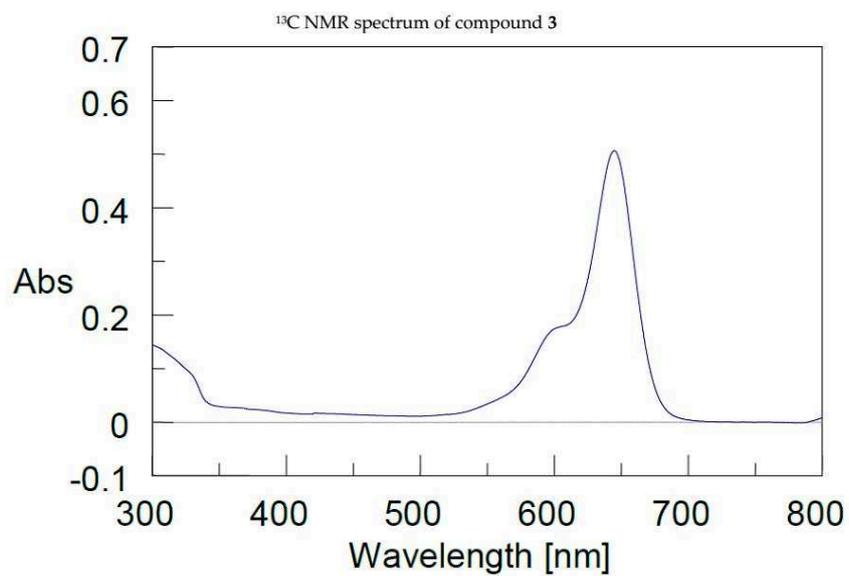
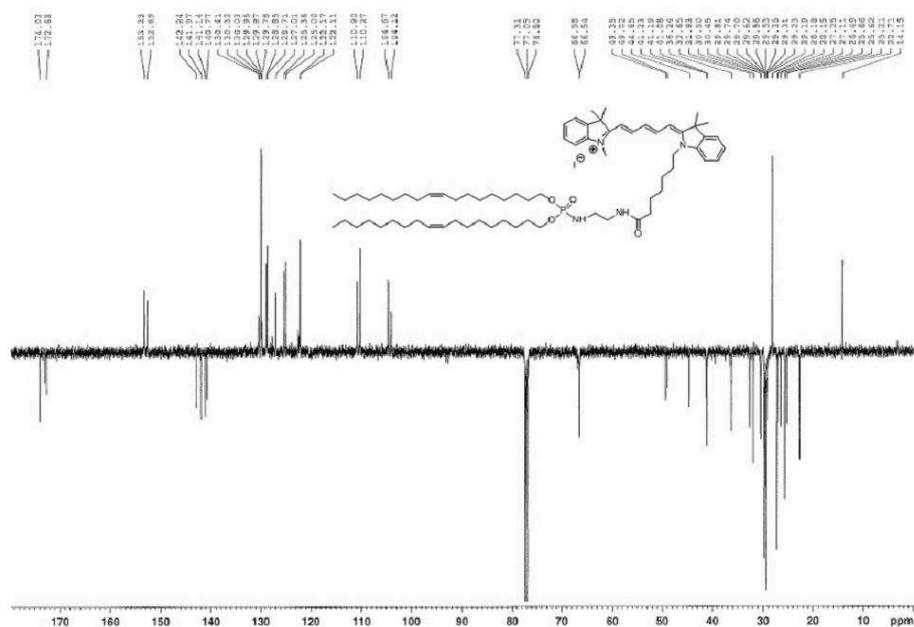


¹H-NMR spectrum of compound 3



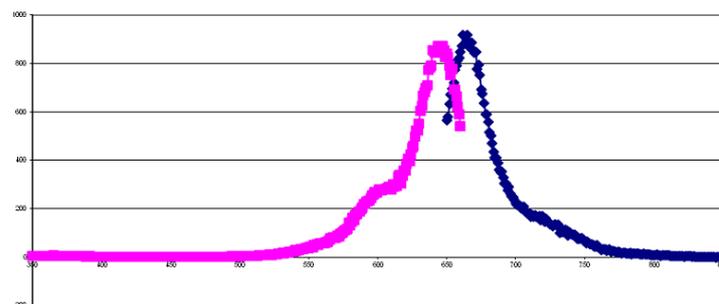
³¹P NMR spectrum of compound 3

Int. J. Mol. Sci. **2015**, *16*, S1–S3



Absorbance and fluorescence spectrum of compound 3

Int. J. Mol. Sci. **2015**, *16*, S1–S3



Fluorescence spectrum of compound 3

Scheme S1. NMR, absorbance and fluorescence spectra compound 3.

2 Évaluation de nouveaux lipophosphoramidates comportant chaînes lipidiques différentes pour le transfert de gènes

Au cours de sa thèse, Stéphanie Le Corre (équipe « phosphore et vectorisation », CNRS UMR 6521) a synthétisé de nouveaux composés asymétriques c'est-à-dire avec une partie hydrophobe comportant deux chaînes lipidiques différentes dans le but d'évaluer l'impact de la présence de deux chaînes lipidiques différentes sur les propriétés physicochimiques et transfectantes des vecteurs. Il s'agissait également d'optimiser les procédés de formulations, en comparaison avec les lipides symétriques (partie hydrophobe : deux chaînes lipidiques identiques). La nature du domaine hydrophobe a un rôle important dans l'organisation supramoléculaire des objets formés. Par conséquent, l'incorporation de deux chaînes grasses différentes, l'une facilitant la formulation des composés (ex. chaîne oléyle), et l'autre favorisant l'organisation supramoléculaire en phase hexagonale inverse (ex. chaîne phytanyle) est une approche intéressante pour l'optimisation de vecteurs synthétiques. Pour cela, une série de composés (symétriques et non-symétriques) incorporant soit des chaînes grasses saturées (C12 :0, C14 :0, C18 :0), soit des chaînes lipidiques avec insaturations (ex. chaînes oléyles), soit des chaînes ramifiées (chaînes phytanyles), et/ou un motif cholestérol ont été synthétisés. Les nouveaux composés (symétriques et non-symétriques) ont une taille relativement petite et un potentiel zêta positif. L'évaluation sur modèles cellulaires montre que les formulations (symétriques et asymétriques) sont efficaces par rapport à la lipofectamine sur les lignées transfectées, mais ne nous a pas permis de conclure quant à la supériorité de l'efficacité de transfection des lipides non-symétriques par rapport aux lipides symétriques. En revanche, ces résultats nous ont permis d'identifier deux lipophosphoramidates non-symétriques prometteurs pour le transfert de gènes qui sont le composé **4** (une chaîne oléyle et une chaîne phytanyle) et le composé **6** (une chaîne lauryle et une chaîne phytanyle). En effet, en plus d'être très efficaces sur les lignées cellulaires testées, leur formulation sous forme de liposomes est relativement simple par rapport au composé **20** comportant deux chaînes phytanyles. Le temps d'hydratation des composés **4** et **6** est d'une nuit au lieu de sept jours pour le composé **20**. Ces vecteurs seront testés in vivo prochainement, afin comparer leurs capacités à transfecter les cellules épithéliales pulmonaires avec celle du BSV18 (deux chaînes phytanyles) évalué précédemment dans l'équipe.



Cationic lipophosphoramidates with two different lipid chains: synthesis and evaluation as gene carriers†

Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 1463

Stéphanie S. Le Corre,^{a,b} Mathieu Berchel,^{a,b} Nawal Belmadi,^{b,c} Caroline Denis,^{b,c} Jean-Pierre Haelters,^{a,b} Tony Le Gall,^{b,c} Pierre Lehn,^c Tristan Montier^{b,c,d} and Paul-Alain Jaffrès^{*a,b}

Received 14th November 2013,
Accepted 19th December 2013
DOI: 10.1039/c3ob42270d

www.rsc.org/obc

Cationic lipids constitute a family of synthetic vectors commonly used for nucleic acids delivery. We herein report the results of a systematic study that aimed to compare the transfection efficacies of cationic lipophosphoramidates possessing either two identical lipid chains (termed symmetric cationic lipids) or two different lipid chains (non-symmetric cationic lipids). In addition, we also compared the transfection results of such a 'molecular approach' (the two different lipid chains being included in the same molecule) with those of a 'supramolecular approach' in which two types of symmetrical cationic lipids were mixed in one liposomal formulation. Thus, the present work allowed us first to optimize the methods used to synthesize non-symmetric cationic lipophosphoramidates. In addition, we could also identify two non-symmetric cationic lipids exhibiting high transfection efficiencies with a series of mammalian cell lines, both vectors being characterized by a single phytanyl chain and either an oleyl or a lauryl lipid chain.

Introduction

Cationic lipids constitute a family of vectors for nucleic acid delivery that have been widely studied since the pioneering work of Felgner,¹ Behr² and Wu.³ This class of vectors presents the uniqueness, when compared to viral or polymer-based vectors, to possess a fully defined structure at its molecular level. Moreover, fine-tuning of the physico-chemical properties of the supramolecular aggregates resulting from the self-assembly of a liposomal solution and plasmid DNA (pDNA) can be achieved by the incorporation of a helper lipid.⁴ Many structural modifications were performed to produce such new synthetic vectors with either an original polar head, a new

hydrophobic domain or a reactive functional group that renders these vectors sensitive to different stimuli (pH,⁵ redox,⁶ enzyme,⁷ light,⁸ and ultrasound⁹). All these studies led to the conclusion that the hydrophobic domain¹⁰ and the cationic polar head group¹¹ constitute two important structural features that have an impact on both *in vitro* and *in vivo* transfection efficiency. As regards the lipid part, we have previously reported the high *in vivo* transfection efficacies of vectors belonging to a class of bio-inspired cationic lipids (lipophosphoramidates)¹² and characterized by polyunsaturated lipid chains.¹³ Moreover, the use of phytanyl chains (methylated alkyl chains) improved even further these results.¹⁴ The presence of two phytanyl chains likely explains these interesting results. Indeed, such a vector adopts a non-lamellar supramolecular organisation according to ³¹P NMR studies. In all those recent studies and in many others recently reviewed,¹⁰ the cationic lipids are composed of a hydrophobic domain consisting of two identical lipid chains (this type of structure will be identified herein as a 'symmetric cationic lipid' in opposition to cationic lipids with two different lipid chains termed 'non-symmetric cationic lipids'); this may actually be explained by chemical synthesis reasons (symmetric lipid derivatives being indeed easier to produce than non-symmetric ones as their synthesis usually involves protection/deprotection steps¹⁵). It has however been reported that non-symmetric cationic lipids can have remarkable efficacies in *in vitro*¹⁶ and *in vivo*

^aUMR CNRS 6521; SFR ScInBioS, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, Faculté des Sciences, 6 avenue Victor Le Gorgeu, 29238 Brest, France. E-mail: pjaffres@univ-brest.fr

^bIBiSA SynNanoVect platform, SFR ScInBioS, Université de Bretagne Occidentale, 29238 Brest Cedex 3, France

^cUnité INSERM 1078; SFR ScInBioS, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, 22 avenue Camille Desmoulins, 29238 Brest, France

^dCHRU de Brest, laboratoire de biochimie et de pharmacotoxicologie, boulevard Tanguy Prigent, 29609 Brest cedex; DUMG, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, 22 avenue Camille Desmoulins, 29238 Brest, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3ob42270d

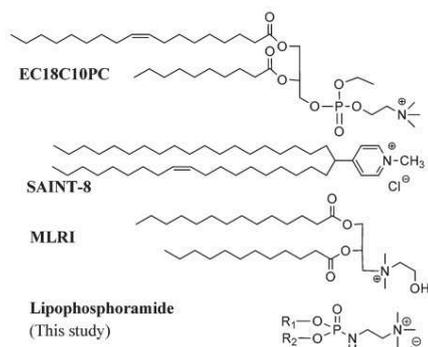


Fig. 1 Chemical structures of non-symmetrical cationic lipids (EC18C10PC, SAINT-8, MLRI) and structure of the targeting non-symmetrical lipophosphoramidates.

transfection assays.¹⁷ An example is the cationic lipid MLRI (a glycerolipid with a non-symmetric lipid domain – C12:0 and C14:0 – Fig. 1).¹⁸ It should however be stressed here that the comparison of the transfection efficacies of symmetric and non-symmetric cationic lipids is an issue only rarely addressed in previous studies. Furthermore, the few studies addressing this point led to somewhat contradictory conclusions. For instance, by using a series of cationic lipids characterized by a cyclic ammonium polar head, Chaudhuri *et al.* could not reach a firm conclusion, as, depending on the experimental parameters, the best vector was either the symmetric or the non-symmetric cationic lipid.¹⁹ Interestingly, Woude *et al.*, who were the first to compare the influence of non-symmetrical lipid chains on gene transfection activity, have reported that the cationic lipid Saint-8 (a pyridinium derivative possessing an oleyl – C18:1- and a stearyl – C18:0 – lipid chain – Fig. 1) was more efficient than its bis-stearyl derivative but less efficient than its bis-oleyl analogue (*in vitro* assays).²⁰ Springer *et al.* have shown that a cationic lipid with a C12:0 and a C14:0 lipid chain was more efficient than the corresponding symmetric cationic lipids.²¹ MacDonald *et al.* who compared several symmetric and non-symmetric cationic phosphoglycerolipids (formulated with DOPE) found that the highest transfection activity was observed with a symmetric cationic lipid.²² Finally, Nantz *et al.* have shown that the non-symmetric cationic lipid MLRI was more efficient than the symmetric cationic lipid tested (*in vivo* assays).²³ All those contradictory results strongly invited us to further investigate this question in a manner permitting us to evaluate more systematically the use of non-symmetric cationic lipids for gene transfection. Thus, in the present study, we report the synthesis of non-symmetric cationic lipophosphoramidates in which the lipid chains exhibit different features: saturated, unsaturated or branched alkyl chains. Moreover, the inclusion of a cholesteryl unit was also considered since it may be an interesting lipid domain as suggested by biological results.²⁴

For obvious comparative purposes, the corresponding symmetric phosphoramidates were also synthesized and studied. In the present work, we also investigated the influence of the lipid domain (symmetric *versus* non-symmetric) on gene transfection activity not only at the molecular level (the presence of two different chains in the structure of a given cationic lipid) but also at the supramolecular level (a mixture of two symmetric cationic lipids). Finally, it is noteworthy that the ‘molecular approach’ required first to develop a robust synthetic method to produce non-symmetric cationic lipids. Moreover, we also aimed to develop a synthetic pathway allowing the production of large quantities of materials (>1 g) since large-scale production is an important issue when considering *in vivo* transfection experiments.

Results and discussion

In our previous work we have reported the synthesis of symmetric cationic lipophosphonates and lipophosphoramidates and their use in gene delivery. These bio-inspired phospholipids²⁵ were synthesised by following versatile procedures allowing different structural modifications, including the modification of the nature of the lipid chains,¹⁴ the phosphorus functional group²⁶ and the structure of the cationic polar headgroup.^{11a} However, we have never studied so far the synthesis and use of cationic lipophosphoramidates bearing two different lipid chains, although that previous work had indicated that other non-symmetric cationic lipids could exhibit high transfection efficacies.^{18–20,24} In addition, our goal was not only to identify novel efficient transfection agents, but we also wondered whether replacing a phytanyl chain by another lipid alkyl chain might facilitate the preparation of liposomal solutions while keeping the very high transfection efficiency observed with the bis-phytanyl phosphoramidate BSV18 (whose formulation as a liposomal solution was found to be quite difficult).¹⁵

The synthesis of non-symmetric cationic lipophosphoramidates was first attempted following the synthetic scheme previously reported for the synthesis of symmetric lipophosphoramidates.¹⁵ This approach required first the preparation of a dialkylphosphite bearing, in the present case, two different alkyl chains. For this purpose, a transesterification reaction involving diphenylphosphite and two different lipid alcohols (myristyl alcohol and oleyl alcohol, Fig. S11†) was investigated. This method, initially reported by Hoffman *et al.*²⁷ for the synthesis of a non-symmetric bis lipid-phosphite, produced in our hands the expected non-symmetric phosphite but with a purity that never exceeded 90% (see ESI S11†). Modification of the temperature of the reaction media (0 °C or 20 °C) as well as regulation of the addition rate (rapid or very slow addition rate controlled by a syringe pump) did not improve this result.

We thus attempted a second method in order to obtain non-symmetrical phosphites with a better purity. Here, the first step was the mono-hydrolysis of symmetrical

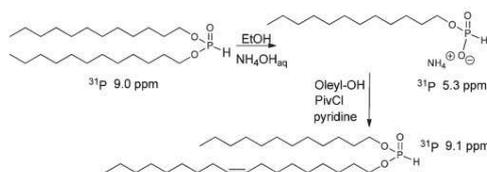


Fig. 2 Two steps sequence for the synthesis of non-symmetric-dialkylphosphite from symmetric dialkylphosphite.

dialkylphosphite with ammonium hydroxide in ethanol by adapting a reported method (Fig. 2).²⁸ The monoalkylphosphite was obtained as a white solid after a tedious step of concentration under vacuum (vacuum must be carefully controlled to prevent bumping). Next, by adapting a reported procedure,²⁹ this mono-alkylphosphite, isolated as a salt, was then alkylated with oleyl alcohol *via* the formation of a mixed anhydride, which was formed *in situ* by the addition of pivaloyl chloride. This method produced the expected non-symmetrical phosphite but, unfortunately, the next step (Atherton-Todd reaction) was unsuccessful, likely because of some remaining traces of acid derivatives. Moreover, the experimental difficulties probably due to the tensioactive properties of the intermediate monoalkylphosphite led us to investigate a third synthetic strategy. For the third method (Fig. 3) POCl_3 was used as a starting compound. Three successive additions of nucleophilic reagents (two lipid alcohols and one amine) were achieved in diethylether used as a solvent and in the presence of triethylamine acting as a base. After each nucleophile addition, ^{31}P NMR was used to check the completeness of the reaction. Moreover, the temperature of the reaction medium was very carefully controlled. The addition of the first alcohol was achieved at a starting temperature of $-5\text{ }^\circ\text{C}$ and then the temperature was slowly increased up to $5\text{ }^\circ\text{C}$ in 2 h. Next, the second alcohol was added at $5\text{ }^\circ\text{C}$ and the reaction medium was stirred for 4 h while the temperature of the reaction medium was slowly increased up to $20\text{ }^\circ\text{C}$. Then, after checking by ^{31}P NMR the completeness of this step, *N,N*-dimethylethylenediamine was added at $20\text{ }^\circ\text{C}$ and the reaction medium was stirred further for 1 h. In this procedure, the shortest lipid alcohol was first added, followed by the second lipid alcohol and, in the end, the more reactive nucleophilic reagent which was, herein, the primary amine derivative. This procedure was very efficient and, as observed by ^{31}P NMR and other spectroscopic methods, the non-symmetric lipophosphoramidate was

the sole compound detected (see SI2†). This one-pot procedure allowed the production of up to 5 g of non-symmetric lipophosphoramidate and it is likely that larger quantities can be obtained.

Following this procedure, a series of seven non-symmetric lipophosphoramidates was synthesised as shown in Table 1 (NMR data, SI3†). This series includes saturated lipid chains (C12:0; C14:0; C18:0), substituted alkyl chains (phytanyl), unsaturated alkyl chains (oleyl) and a cholesteryl moiety. These lipophosphoramidates were transformed into cationic lipids by the alkylation of the tertiary amine with methyl iodide to produce the cationic non-symmetric lipophosphoramidates shown in Table 1. With the aim of studying the consequences arising from the presence of two different lipid chains in the molecular structure of a given vector on gene transfection efficiency, we next undertook to compare the efficiencies of such non-symmetric vectors with those of symmetric lipids. These symmetric compounds (see Table 1) were synthesized according to reported procedures¹³ starting from an Atherton-Todd coupling between dialkylphosphite and *N,N*-dimethylethylenediamine followed by the quaternization of the amine with methyl iodide. For the cholesteryl-based derivatives (compounds 13 and 14; Table 1), the cholesteryl fragment was first functionalized *via* a carbamate functional group with the aim to incorporate a primary alcohol function which was subsequently used to produce cholesterol-based amphiphiles (13 and 14). It is worth noting that the synthesis of the bis-cholesteryl derivative was not successful since it was isolated as a mixture of compounds and it was consequently not included in the biological tests.

For the transfection experiments, the cationic lipids were formulated as liposomal solutions by hydration of a lipid film followed by a sonication period (60 min.). The liposomal solutions (1.5 mmol L^{-1}) were characterized by DLS to determine both the size of the supramolecular objects formed and their zeta potentials. As shown in ESI (SI4†), the sizes of the liposomes mainly ranged from 150 to 250 nm with, in some cases, smaller aggregates (70–130 nm). As expected, the zeta potentials were clearly positives (from +30 to +66 mV).

We next evaluated the pDNA compaction ability and the *in vitro* gene transfection efficiency of these liposomal preparations. Obviously, both non-symmetric lipids and symmetric ones were studied here. Accordingly, for each non-symmetric cationic lipid, bearing the lipid chains R^1 and R^2 , the two symmetric cationic lipids (R^1, R^1 and R^2, R^2) were also tested. Moreover, an additional formulation, based on a mixture of the two

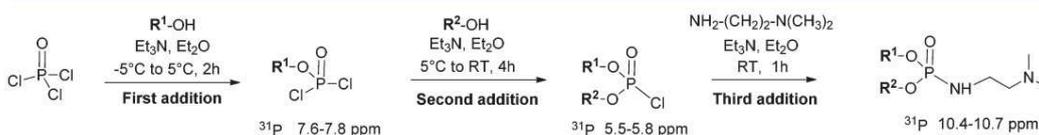
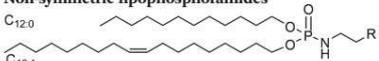
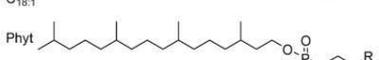
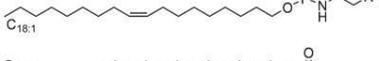
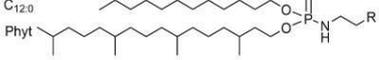
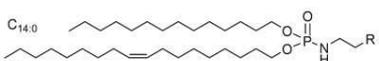
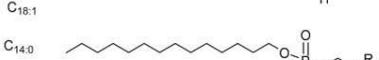
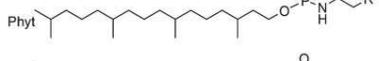
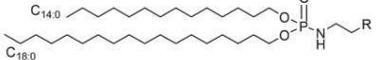
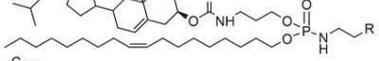
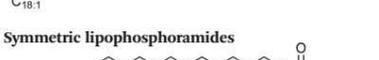
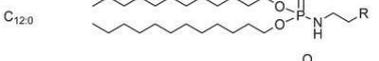
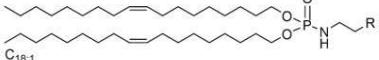
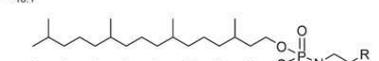
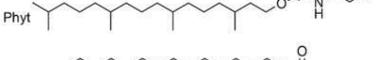
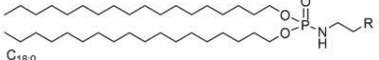
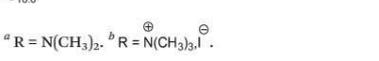
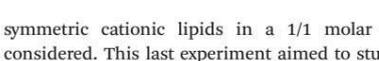
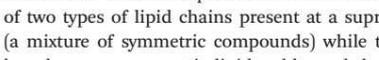
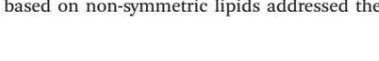


Fig. 3 One-pot procedure for the synthesis of non-symmetric lipophosphoramidate ($\text{R}^1 \neq \text{R}^2$).

Table 1 Molecular structure of the symmetric and non-symmetric neutral and cationic phospholipids synthesized in this study

Non-symmetric lipophosphoramides	
	1 ^a
	2 ^b (BSV 109)
	3 ^a
	4 ^b (BSV 110)
	5 ^a
	6 ^b (BSV 111)
	7 ^a
	8 ^b (BSV 112)
	9 ^a
	10 ^b (BSV 113)
	11 ^a
	12 ^b (BSV 114)
	13 ^a
	14 ^b (BSV 115)
	15 ^a
	16 ^b (BSV 34)
	17 ^a
	18 ^b (BSV 36)
	19 ^a
	20 ^b (BSV 35)
	21 ^a
	22 ^b (BSV 61)
	23 ^a
	24 ^b (BSV 101)

^a R = N(CH₃)₂, ^b R = N(CH₃)₃⁺ I⁻.

symmetric cationic lipids in a 1/1 molar ratio, was also considered. This last experiment aimed to study the influence of two types of lipid chains present at a supramolecular level (a mixture of symmetric compounds) while the formulations based on non-symmetric lipids addressed the question of the

Table 2 Relative transfection efficacies of non-symmetric and symmetric lipophosphoramides on four cell lines. For each cell line, data were normalized by assigning a value of 1 to LFM luciferase expression

Series	Number – structure ^a	A549 ^b	16HBE ^b	CFBE ^b	SKMel28 ^b	
1	2	C12:0/C18:1	2	27	318	1
	16	C12:0/C12:0	1	1	3	1
	18	C18:1/C18:1	1	39	167	8
2	16+18	(1/1 ratio)	2	34	222	<1
	4	Phyt/C18:1	13	105	101	19
	18	C18:1/C18:1	1	39	167	8
	20	Phyt/Phyt	38	683	159	13
3	18+20	(1/1 ratio)	2	122	40	13
	6	C12:0/Phyt	39	381	280	18
	16	C12:0/C12:0	1	1	3	1
	20	Phyt/Phyt	38	683	159	13
4	16+20	(1/1 ratio)	2	128	32	1
	8	C14:0/C18:1	2	24	10	1
	18	C18:1/C18:1	1	39	167	8
	22	C14:0/C14:0	1	5	5	1
5	18+22	(1/1 ratio)	2	28	6	1
	10	C14:0/Phyt	13	79	40	16
	20	Phyt/Phyt	38	683	159	13
	22	C14:0/C14:0	1	5	5	1
6	20+22	(1/1 ratio)	8	88	33	32
	12	C14:0/C18:0	<1	<1	<1	<1
	24	C18:0/C18:0	<1	<1	<1	<1
	22	C14:0/C14:0	1	5	5	1
7	24+22	(1/1 ratio)	<1	<1	<1	<1
	14	Chol/C18:1	<1	2	3	<1
	18	C18:1/C18:1	1	39	167	8
	Lipofectamine		1	1	1	1

^a Label code: lauryl lipid chain (C12:0); oleyl lipid chain (C18:1); phytanyl lipid chain (Phyt); myristyl lipid chain (C14:0); stearyl lipid chain (C18:0); cholesterol lipid chain (Chol). ^b Relative transfection efficacies were calculated as follow: [RLU per mg of a selected formulation at CR = 4]/[RLU per mg of Lipofectamine (LFM) at its best CR (CR = 8)].

influence of the structure of the lipid domain at the molecular level.

As indicated above, to evaluate the pDNA condensation ability, DNA retardation assays on agarose gel electrophoresis were performed for each type of lipoplex at different charge ratios (CR) (see SI-5[†]). In these experiments, a full condensation of pDNA was observed at CR equal to or higher than 4. No significant differences were observed when symmetric and non-symmetric derivatives were compared.

For comparison of the transfection efficacies four cell lines were considered (A549, 16HBE, CFBE and SKMel28). The A549, 16HBE and CFBE cell lines are derived from human airway epithelial cells (lung carcinoma, normal bronchial epithelium and cystic fibrosis (CF) bronchial epithelium, respectively); these cell lines were chosen with a view to evaluate novel vectors for nonviral lung gene therapy for CF, the most common hereditary genetic disease in the Caucasian population. In addition, SKMel 28 (human melanoma cells) was selected to study the transfection of another cancer cell line in connection with our studies aiming to develop new therapeutic approaches.³⁰ The luciferase-expressing pCMV-*Luc* plasmid was used in these *in vitro* transfection assays. This plasmid allowed the quantification of the transfection activity by bioluminescence (activity expressed as Relative Light Units

(RLU) per mg protein). Each formulation was tested at different cationic lipid/pDNA CR (1, 2, 4 and 8) in triplicate and a total of 26 formulations were studied. As the amount of experimental data obtained was hence very high, the full dataset for these transfection experiments are shown in ESI (see SI6†). Thus, we only present here a concise analysis of all those transfection results with the view to get a better insight into the influence of non-symmetric vectors on transfection efficacy and thus also to select the most promising formulation. Practically, we have selected some data and presented them, as detailed below, in a manner that we found likely to facilitate the comparison between the different vectors as shown in Table 2. First, for our analysis, we only took into account the transfection activity values obtained at a lipoplex CR of 4. Although other CRs were tested (see ESI†), we have indeed previously reported that a CR of 4 (a clearly positive but not too high CR) is generally not only efficient for *in vitro* transfection but also for *in vivo* gene transfection.¹⁴ Second, the transfection activity values observed (expressed as RLU per mg protein) were divided by the activity of the commercially-available control cationic lipid Lipofectamine (LFM) used at its best CR (CR = 8), a procedure yielding relative transfection efficacy values. These values are shown in Table 2. In order to allow a quick identification of the best vectors in Table 2, those displaying a transfection efficacy 10-fold (A549), 100-fold (16HBE and CFBE) or 15-fold (SKMel28) above the efficacy of the Lipofectamine control are shown shaded. Of note, Table 2 shows the relative transfection values of the various formulations grouped into classes (series), each series being composed (except for series 7) of the non-symmetric compound, its two corresponding symmetric compounds and the formulation consisting of the mixture of the two symmetric compounds.

The first interesting information is that most of the formulations tested were more efficient (relative value >1) than the control Lipofectamine and frequently a 10 times higher efficacy was observed, except for cationic lipids bearing saturated linear alkyl chains (series 6). Indeed, the cationic lipid 24, which possesses two C18:0 lipid chains, was inefficient while the decrease of the chain length (C14:0; compound 22) resulted in slightly improved efficacies but at a level still close to those observed with LFM (values close to 1). In this series, mixing of the two lipid chains at a molecular level (non-symmetric cationic lipid 12) produced a cationic lipid with low transfection efficacy. Second, it is also noteworthy here that two cell lines (16HBE and CFBE) were easily transfected with the lipophosphoramidates while the two others (A549 and SKMel28) were more difficult to transfect. This is especially interesting when considering lung gene therapy for Cystic Fibrosis, where the bronchial epithelium is the target issue.

Among the symmetric cationic lipids, two (bis-oleyl C18:1 18 and bis-phytanyl 20) were clearly identified as the best vectors tested. This is consistent with our previous results showing that these two types of lipid chains generated very efficient formulations for gene delivery when associated with different cationic polar headgroups. Interestingly, the cationic

lipophosphoramidate 4 (series 2), in which an oleyl chain is combined with a phytanyl chain, exhibited good transfection efficacies with all four cell lines tested, these efficacy values remaining nevertheless lower, in some cases, than those observed with the symmetric bis-phytanyl 20. It should however be stressed here that the liposomal formulation of cationic lipid 4 was readily obtained after one night of hydration, while a hydration period of at least 7 days was required for compound 20. The formulation of a mixture of 18 and 20 in a 1/1 ratio was also readily achieved by hydration (1 night) but this formulation was slightly less efficient than those based on the non-symmetric compound 4.

Next, we explored the transfection efficiencies of the association of oleyl chains (C18:1) with other alkyl chains. Its association with a lauryl chain (C12:0) produced compound 2 (series 1, Table 2). This non-symmetric cationic lipid 2 exhibited good to excellent transfection efficacies. When compared to the bis-oleyl derivative 18, its efficiency was almost similar to or even better in the case of CFBE cells. However, the transfection efficacies of this non-symmetric and of the best symmetric derivative of this series (compound 18) were not very different. In this series, the mixture of the two symmetric compounds 16 and 18 resulted in a formulation exhibiting relative transfection efficacy values similar to those observed for compound 18 alone (symmetric C18:1) or the non-symmetric compound 2.

The association of a C18:1 with a C14:0 lipid chain (compound 8, series 4) led to similar conclusions which can be summarised as follows: the best vector in this series was the symmetric bis-oleyl derivative 18 while the non-symmetric compound 8 and the mixture of symmetric cationic lipids (bis-myristyl 22 and bis-oleyl 18) produced slightly less efficient formulations. The last combination including an oleyl chain included combining it with a cholesteryl moiety. In that case, due to the difficulty of producing the bis-cholesteryl derivatives, only two formulations were tested as indicated in Table 2. Here, the replacement of one oleyl chain by a cholesteryl moiety clearly decreased the transfection efficacies. Finally, we consider it relevant to further focus our attention on cationic lipids with a phytanyl chain since our previous work demonstrated that a cationic lipophosphoramidate with two phytanyl chains is very efficient for both *in vitro* and *in vivo* experiments.¹⁴ These previous results were attributed to the tendency of this type of cationic lipid to adopt an inverted hexagonal phase. Here, as discussed above, the association of a phytanyl and an oleyl chain was an interesting combination not only because high transfection efficacies were obtained but also because the duration of the formulation protocol was strongly shortened when compared to the bis-phytanyl compound 20. The association of one phytanyl and one lauryl chain (C12:0/Phyt compound 6 – series 3, Table 2) produced one of the best vectors among those tested in this study. Indeed, the transfection efficacies were even improved when compared to the non-symmetric compound 4 (Phytanyl-oleyl). The comparison of the transfection efficacies obtained with compound 6 and with a mixture of the symmetric compounds

16 (bis-lauryl) and **20** (bis-phytanyl) was clearly in favour of the non-symmetric cationic lipid **6**. It is noteworthy that this vector **6** exhibited excellent transfection efficacies on the four cell lines tested. Interestingly, the non-symmetric compound **6** was readily formulated as a liposomal solution after only one night of hydration. Finally, the last series of compounds (series 5, Table 2) was characterized by the association of a phytanyl and a myristyl chain (C14:0). In that case, the best vector was clearly the bis-phytanyl derivative **20** while the non-symmetric compound **10** (C14:0/phyt) and the mixture of the two symmetric derivatives **22** (bis-myristyl) and **20** (bis-phytanyl) exhibited almost similar transfection efficacies.

Altogether, these transfection results indicate that it is not possible to formulate a general rule stipulating that non-symmetric derivatives would be more or less efficient than symmetric cationic lipids. However, the present work allowed us to identify two promising non-symmetric cationic lipids: compound **4** (with oleyl and phytanyl chains) and compound **6** (with lauryl and phytanyl chains). Indeed, these two non-symmetric cationic lipids exhibited very high transfection efficacies with all 4 cell lines tested. Moreover, their formulation as liposomal solution was significantly simpler when compared to the bis-phytanyl-based cationic lipid **20**. Indeed, liposomal solutions of compounds **4** or **6** can be readily obtained with a hydration period of one night instead of at least 7 days for compound **20**.

The toxicity of lipoplexes produced from both symmetrical and non-symmetrical cationic lipids was evaluated. Most of the formulations were not toxic and presented similar results to the untransfected cells (SI7†).

Conclusion

Different methods were tested for the synthesis of cationic lipophosphoramidates possessing two different lipid chains. Among these methods, the sequential addition of the two different lipid alcohols on phosphorus oxychloride followed by the addition of the amine, in a one-pot sequence, was the most efficient. This synthetic scheme allowed the production of a series of 7 non-symmetric cationic lipids and, more widely, it appears to be the method of choice for the synthesis of amphiphilic derivatives characterized by two different hydrophobic domains. In this study, we systematically compared the transfection efficacy of these non-symmetric cationic lipophosphoramidates with that of their symmetric counterparts (characterized by two identical hydrophobic lipid chains). Four cell lines were used for this purpose. The transfection results indicate that it is not possible to reach a general conclusion stipulating that the non-symmetric cationic lipids are always better or worse than the symmetric vectors. Indeed, the choice of the two lipid chains combined in the structure of a non-symmetric cationic lipid appears to have a great influence on the final transfection efficiency. Our study once again indicates that the presence of two identical phytanyl chains (compound **20**) leads to an efficient vector whose formulation in liposomal solution requires a prolonged hydration time.

Indeed, this result is consistent with our previous study reporting the interesting transfection results obtained with the vector BSV18 (a bis-phytanyl lipophosphoramidate).¹⁴ Most interestingly, the two non-symmetric cationic lipids **4** (BSV110) and **6** (BSV11) exhibited high transfection efficacies with all four mammalian cell lines tested and it is noteworthy that liposomal formulations of compounds **4** or **6** could be obtained more easily than in the case of the symmetric cationic lipid **20**. This study warrants further evaluations of these cationic lipids, especially under *in vivo* experimental settings. Moreover, as we have recently evidenced that good transfection reagents in that family of vectors can also display potent antibacterial activities,³¹ the effects of such compounds with regard to different bacterial strains should be also determined. Finally, our results suggest that the incorporation of a phytanyl chain may constitute a valuable strategy to obtain cationic lipids exhibiting high transfection efficacies.

Experimental section

Solvents were dried with a solvent purification system MBraun-SPS (THF, CH₂Cl₂). All compounds were fully characterized by ¹H (400.133 MHz), ¹³C (125.773 MHz) and ³¹P (161.970 MHz) NMR spectroscopy (Avance DRX 400 and Avance DRX 500 spectrometers). The lipids were purified by flash chromatography. Coupling constants *J* are given in Hertz. The following abbreviations were used: s for singlet, d doublet, t triplet, q quadruplet, and m for multiplet. When needed, ¹³C and ³¹P heteronuclear HMQC and HMBC were used to unambiguously establish molecular structures. Mass spectroscopy analyses were performed by Brest (service commun de spectrometrie de masse) on a Bruker Autoflex MALDI TOF-TOF III LRF200 CID. Commercial compounds [oleyl alcohol 85%, 2-bromoethylamine hydrobromide] were used as received except DIPEA which was distilled over KOH. The mean particle diameter and zeta potential (ξ) of the liposomes and lipoplexes were measured using a 3000 Zetasizer (Malvern Instruments) at 25 °C (see ESI†).

General protocol for the synthesis of cationic lipophosphoramidates with two distinct alkyl chains

Step 1: synthesis of neutral lipophosphoramidates. *Synthesis of O-lauryl-O-oleyl-N-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate 1*

Triethylamine (2.27 mL; 16.3 mmol) was added to a cooled (0 °C) solution of POCl₃ (2.50 g; 16.3 mmol) in diethylether (20 mL) and placed under an argon atmosphere. Dodecanol (3.04 g; 16.3 mmol) was then added dropwise. The solution was stirred for 1 h 30 min at 0 °C. Then, a solution of oleyl alcohol (4.38 g; 16.3 mmol) and triethylamine (2.49 mL; 17.9 mmol) placed in diethylether (10 mL) was slowly added at 0 °C. This solution was further stirred for 4 h while the temperature was slowly increased up to 20 °C. Then, a solution of *N,N*-dimethylethylenediamine (1.44 g; 16.3 mmol) and triethylamine (2.27 mL; 16.3 mmol) in diethylether (5 mL) was added and the solution was stirred for 1 h. Finally, diethylether was

added (50 mL) and the solution was washed with brine. The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to produce the desired compound as an oil that was engaged in the next step without any further purification (77% yield; 7.39 g).

Step 2: synthesis of the cationic lipophosphoramidates by alkylation. Synthesis of 2-(*O*-lauryl-*O*-oleylphosphoramidoylethyl)trimethylammonium iodide 2

Methyl iodide (1.00 mL) was added to a solution of *O*-lauryl-*O*-oleyl-*N*-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate (200 mg; 0.34 mmol; 1 eq.) in 5 mL of CH_2Cl_2 . The mixture was stirred at R.T. overnight. The excess of methyl iodide and CH_2Cl_2 was removed under vacuum. The compound was purified by chromatography on silica gel to give the compound.

***O*-Lauryl-*O*-oleyl-*N*-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate 1.** Isolated as a yellow oil (7.39 g; 77% yield). $^1\text{H-NMR}$ (400.04 MHz, CDCl_3): 0.87 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 6H, CH_3); 1.25 (s, 40H, CH_2); 1.65 (m, 4H, CH_2 β); 1.99 (m, 4H, CH_2 -CH=CH); 2.23 (s, 6H, N-(CH_3)₂); 2.41 (t, $^3J_{\text{HH}} = 4$ Hz, 2H, CH_2 -N-(CH_3)₂); 2.97 (m, 2H, NH- CH_2); 3.30 (m, 1H, NH); 3.97 (m, 4H, CH_2 α); 5.34 (m, 2H, CH=CH). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.80 MHz, CDCl_3): 13.99 (s, 2 \times CH_3); 22.58 (s, CH_2); 25.51 (s, CH_2); 27.10 (s, CH=CH- CH_2); 29–30 (s, CH_2); 30.22 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 β); 30.76 (s, CH_2); 31.81 (s, CH_2); 38.44 (s, CH_2 -NH); 44.89 (s, N(CH_3)₂); 59.50 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 -N(CH_3)₂); 66.16 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5$ Hz, CH_2 α); 129.68 (s, CH=CH); 129.81 (s, CH=CH). $^{31}\text{P-NMR}$ (161.94 MHz, CDCl_3): 10.7. IR (cm^{-1}): 3200 (ν_{NH}); 1231 ($\nu_{\text{P=O}}$); 1005 ($\nu_{\text{P-O-C}}$). MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_3\text{P}$ (M + H): 587.528; found 587.485.

2-(*O*-Lauryl-*O*-oleylphosphoramidoylethyl)trimethylammonium iodide 2. Isolated as a pale yellow wax (200 mg; 81% yield). $^1\text{H-NMR}$ (400.04 MHz, CDCl_3): 0.87 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 6H, CH_3); 1.25 (s, 40H, CH_2); 1.66 (m, 4H, CH_2 β); 2.00 (m, 4H, CH_2 -CH=CH); 3.48 (s, 9H, N-(CH_3)₃); 3.60 (m, 2H, NH- CH_2); 3.87 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, CH_2 -N-(CH_3)₃); 3.98 (q, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 4H, CH_2 α); 4.40 (m, 1H, NH); 5.34 (m, 2H, CH=CH). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.80 MHz, CDCl_3): 14.11 (s, 2 \times CH_3); 22.68 (s, CH_2); 25.58 (s, CH_2); 27.22 (s, CH=CH- CH_2); 29–30 (s, CH_2); 30.43 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 β); 31.91 (s, CH_2); 36.19 (NH- CH_2); 54.87 (s, N(CH_3)₃); 66.77 (s, CH_2 -N(CH_3)₃); 67.15 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5$ Hz, CH_2 α); 129.74 (s, CH=CH); 129.97 (s, CH=CH). $^{31}\text{P-NMR}$ (161.94 MHz, CDCl_3): 9.3. IR (cm^{-1}): 3300 (ν_{NH}); 1223 ($\nu_{\text{P=O}}$); 990 ($\nu_{\text{P-O-C}}$). MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{74}\text{N}_2\text{O}_3\text{P}$ (M⁺): 601.544; found 601.545.

***O*-Oleoyl-*O*-phytanyl-*N*-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate 3.** Isolated as a yellow oil (3.98 g; 85% yield). $^1\text{H-NMR}$ (400.04 MHz, CDCl_3): 0.80–0.90 (m, 18H, CH_3 phytanyl and CH_3 oleyl); 1.00–1.80 (m, 48H, CH_2 , CH phytanyl and CH_2 oleyl); 1.99 (m, 4H, CH_2 -CH=CH); 2.22 (s, 9H, N-(CH_3)₂); 2.38 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, CH_2 -N-(CH_3)₂); 2.95 (m, 2H, NH- CH_2); 3.30 (m, 1H, NH); 3.98 (m, 4H, CH_2 α); 5.34 (m, 2H, CH=CH). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.80 MHz, CDCl_3): 13.99 (s, 2 \times CH_3); 19.40 to 19.80 (s, CH_3 phytanyl); 22.60 to 22.80 (s, CH_3 phytanyl); 22.72 (s, CH_3 - CH_2 oleyl); 24.30 to 24.80 (s, CH_2 phytanyl); 27.19 (s, CH=CH- CH_2); 27.96 (s, CH phytanyl); 29.28 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 β);

29.35 (s, CH phytanyl); 30.47 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 β); 32.78 (s, CH phytanyl); 38.56 (s, NH- CH_2); 37.30 to 37.50 (s, CH_2 phytanyl); 39.41 (s, CH_2 phytanyl); 45.03 (s, N(CH_3)₂); 59.63 (s, CH_2 -N(CH_3)₂); 62.81 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5$ Hz, CH_2 α); 64.73 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5$ Hz, CH_2 α); 129.74 (s, CH=CH); 129.92 (s, CH=CH). $^{31}\text{P-NMR}$ (161.94 MHz, CDCl_3): 10.7. IR (cm^{-1}): 1228 ($\nu_{\text{P=O}}$); 983 ($\nu_{\text{P-O-C}}$). MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{88}\text{N}_2\text{O}_3\text{P}$ (M + H): 699.653; found 699.614.

2-(*O*-Oleoyl-*O*-phytanylphosphoramidoylethyl)trimethylammonium iodide 4. Isolated as a yellow oil (130 mg; 54% yield). $^1\text{H-NMR}$ (400.04 MHz, CDCl_3): 0.80–0.90 (m, 18H, CH_3 phytanyl and CH_3 oleyl); 1.00–1.80 (m, 48H, CH_2 , CH phytanyl and CH_2 oleyl); 2.00 (m, 4H, CH_2 -CH=CH); 3.47 (s, 9H, N-(CH_3)₃); 3.55 (m, 2H, NH- CH_2); 3.87 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, CH_2 -N-(CH_3)₃); 4.00 (m, 4H, CH_2 α); 4.41 (m, 1H, NH); 5.33 (m, 2H, CH=CH). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.80 MHz, CDCl_3): 14.16 (s, 2 \times CH_3); 19.50 to 19.80 (s, CH_3 phytanyl); 22.70 to 22.80 (s, CH_3 phytanyl); 22.72 (s, CH_3 - CH_2 oleyl); 24.40 to 24.90 (s, CH_2 phytanyl); 27.20 (s, CH=CH- CH_2); 28.01 (s, CH phytanyl); 29.28 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 β); 29.35 (s, CH phytanyl); 30.47 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 β); 32.66 (s, CH phytanyl); 36.22 (s, NH- CH_2); 37.30 to 37.50 (s, CH_2 phytanyl); 39.41 (s, CH_2 phytanyl); 54.99 (s, N(CH_3)₃); 65.74 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5$ Hz, CH_2 α); 66.80 (s, CH_2 -N(CH_3)₃); 67.29 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5$ Hz, CH_2 α); 129.79 (s, CH=CH); 130.01 (s, CH=CH). $^{31}\text{P-NMR}$ (161.94 MHz, CDCl_3): 8.9. IR (cm^{-1}): 1224 ($\nu_{\text{P=O}}$); 972 ($\nu_{\text{P-O-C}}$). MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{90}\text{N}_2\text{O}_3\text{P}$ (M⁺): 713.669; found 713.652.

***O*-Lauryl-*O*-phytanyl-*N*-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate 5.** Isolated as a yellow wax (2.01 g; 100% yield). $^1\text{H-NMR}$ (400.04 MHz, CDCl_3): 0.87 (m, H, CH_3); 1.00–1.60 (m, H, CH_2); 2.37 (s, 6H, N-(CH_3)₂); 2.56 (m, 2H, CH_2 -N-(CH_3)₂); 3.08 (m, 2H, NH- CH_2); 3.50 (m, 1H, NH); 3.98 (m, 4H, CH_2 α). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.80 MHz, CDCl_3): 14.10 (s, 2 \times CH_3); 19.40 to 19.80 (s, CH_3 phytanyl); 22.60 to 22.80 (s, CH_3 phytanyl); 22.65 (s, CH_3 - CH_2 lauryl); 24.30 to 24.80 (s, CH_2 phytanyl); 25.59 (s, CH_2 lauryl); 28.02 (s, CH phytanyl); 29.00 to 30.00 (s, CH_2 phytanyl); 31.89 (s, CH phytanyl); 37.20 to 37.60 (s, CH_2 phytanyl); 38.36 (s, NH- CH_2); 39.34 (s, CH_2 phytanyl); 45.00 (s, N(CH_3)₂); 59.55 (s, CH_2 -N(CH_3)₂); 64.77 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5$ Hz, CH_2 α); 66.39 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 α). $^{31}\text{P-NMR}$ (161.94 MHz, CDCl_3): 10.4. IR (cm^{-1}): 1229 ($\nu_{\text{P=O}}$); 971 ($\nu_{\text{P-O-C}}$). MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_3\text{P}$ (M): 617.575; found 617.531.

2-(*O*-Lauryl-*O*-phytanylphosphoramidoylethyl)trimethylammonium iodide 6. Isolated as a yellow oil (140 mg; 57% yield). $^1\text{H-NMR}$ (400.04 MHz, CDCl_3): 0.85–1.70 (m, 62H, CH_2 lauryl and CH_2 phytanyl); 3.45 (s, 9H, N-(CH_3)₃); 3.50 (m, 2H, NH- CH_2); 3.81 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, CH_2 -N-(CH_3)₃); 3.99 (m, 4H, CH_2 α); 4.50 (m, 1H, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.80 MHz, CDCl_3): 14.16 (s, CH_3 lauryl); 19.40 to 19.80 (s, CH_3 phytanyl); 22.70 to 22.80 (s, CH_3 phytanyl); 24.40 to 24.90 (s, CH_2 phytanyl); 25.62 (s, CH_2 lauryl); 28.02 (s, CH phytanyl); 29–30 (s, CH phytanyl and CH lauryl); 30.43 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 β lauryl); 32.85 (s, CH phytanyl); 36.21 (s, NH- CH_2); 37.36 to 37.48 (s, CH_2 phytanyl); 39.40 (s, CH_2 phytanyl); 55.01 (s, N(CH_3)₃); 65.74 (s, CH_2 α); 66.77 (s, CH_2 -N(CH_3)₃); 67.33 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 α). $^{31}\text{P-NMR}$ (161.94 MHz, CDCl_3): 9.3. IR (cm^{-1}): 1223 ($\nu_{\text{P=O}}$); 973 ($\nu_{\text{P-O-C}}$).

MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $C_{37}H_{80}N_2O_3P$ (M^+): 631.591; found 631.540.

O-Myristyl-*O*-oleyl-*N*-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate **7**. Isolated as a yellow wax (2.00 g; 100% yield). 1H -NMR (400.04 MHz, $CDCl_3$): 0.87 (t, $^3J_{HH} = 8$ Hz, 6H, CH_3); 1.24 (s, 44H, CH_2); 1.65 (m, 4H, CH_2 β); 1.99 (m, 4H, CH_2 -CH=CH); 2.28 (s, 6H, N-(CH_3)₂); 2.45 (t, $^3J_{HH} = 4$ Hz, 2H, CH_2 -N-(CH_3)₂); 3.00 (m, 2H, NH- CH_2); 3.35 (m, 1H, NH); 3.97 (m, 4H, CH_2 α); 5.34 (m, 2H, CH=CH). ^{13}C -NMR (125.80 MHz, $CDCl_3$): 14.10 (s, 2 \times CH_3); 22.67 (s, CH_2); 25.60 (s, CH_2); 27.20 (s, CH=CH- CH_2); 29–30 (s, CH_2); 30.22 (d, $^2J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 β); 30.76 (s, CH_2); 31.81 (s, CH_2); 38.38 (s, CH_2 -NH); 44.90 (s, N(CH_3)₂); 59.56 (d, $^2J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 -N(CH_3)₂); 66.41 (d, $^2J_{CP} = 5$ Hz, CH_2 α); 129.76 (s, CH=CH). ^{31}P -NMR (161.94 MHz, $CDCl_3$): 10.6. IR (cm^{-1}): 1231 ($\nu_{P=O}$); 990 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $C_{36}H_{76}N_2O_3P$ ($M + H$): 615.559; found 615.518.

2-(*O*-Myristyl-*O*-oleylphosphoramidoyl)-ethyltrimethylammonium iodide **8**. Isolated as a yellow oil (228 mg; 93% yield). 1H -NMR (400.04 MHz, $CDCl_3$): 0.88 (t, $^3J_{HH} = 8$ Hz, 6H, CH_3); 1.25 (s, 44H, CH_2); 1.66 (m, 4H, CH_2 β); 2.00 (m, 4H, CH_2 -CH=CH); 3.44 (s, 9H, N-(CH_3)₃); 3.58 (m, 2H, NH- CH_2); 3.84 (t, $^3J_{HH} = 8$ Hz, 2H, CH_2 -N-(CH_3)₃); 3.99 (m, 4H, CH_2 α); 4.50 (m, 1H, NH); 5.34 (m, 2H, CH=CH). ^{13}C -NMR (125.80 MHz, $CDCl_3$): 14.16 (s, 2 \times CH_3); 22.73 (s, CH_2); 25.63 (s, CH_2); 27.27 (s, CH=CH- CH_2); 29–30 (s, CH_2); 30.47 (d, $^2J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 β); 30.76 (s, CH_2); 31.97 (s, CH_2); 36.61 (s, CH_2 -NH); 55.18 (s, N(CH_3)₃); 67.31 (d, $^2J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 -N(CH_3)₃); 67.35 (d, $^2J_{CP} = 5$ Hz, CH_2 α); 129.81 (s, CH=CH); 130.02 (s, CH=CH). ^{31}P -NMR (161.94 MHz, $CDCl_3$): 9.4. IR (cm^{-1}): 1240 ($\nu_{P=O}$); 988 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $C_{37}H_{78}N_2O_3P$ (M^+): 629.575; found 629.561.

O-Myristyl-*O*-phytanyl-*N*-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate **9**. Isolated as a yellow oil (7.89 g; 94% yield). 1H -NMR (400.04 MHz, $CDCl_3$): 0.79–1.64 (m, 66H, CH_2); 2.22 (s, 6H, N-(CH_3)₂); 2.39 (m, 2H, CH_2 -N-(CH_3)₂); 2.96 (m, 2H, NH- CH_2); 3.40 (m, 1H, NH); 3.94 (m, 4H, CH_2 α). ^{13}C -NMR (125.80 MHz, $CDCl_3$): 14.10 (s, 2 \times CH_3); 19.50 to 19.60 (s, CH_3 phytanyl); 22.52 (s, CH_3 phytanyl); 22.58 (s, CH_2); 22.61 (s, CH_3 phytanyl); 24.20 to 24.70 (s, CH_2 phytanyl); 25.38 (s, CH_2 lauryl); 27.86 (s, CH phytanyl); 29.00 to 30.00 (s, CH_2 phytanyl); 31.83 (s, CH phytanyl); 32.68 (s, CH_2); 37.20 to 37.60 (s, CH_2 phytanyl); 38.41 (s, NH- CH_2); 39.27 (s, CH_2 phytanyl); 44.87 (s, N(CH_3)₂); 59.55 (s, CH_2 -N(CH_3)₂); 64.62 (d, $^2J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 α); 66.23 (d, $^2J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 α). ^{31}P -NMR (161.94 MHz, $CDCl_3$): 10.7. IR (cm^{-1}): 1229 ($\nu_{P=O}$); 982 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $C_{38}H_{82}N_2O_3P$ ($M + H$): 645.606; found 645.571.

2-(*O*-Myristyl-*O*-phytanylphosphoramidoyl)-ethyltrimethylammonium iodide **10**. Isolated as a yellow oil (0.49 g; 100% yield). 1H -NMR (400.04 MHz, $CDCl_3$): 0.85–1.70 (m, 66H, CH_2 myristyl and CH_2 phytanyl); 3.46 (s, 9H, N-(CH_3)₃); 3.56 (m, 2H, NH- CH_2); 3.87 (t, $^3J_{HH} = 8$ Hz, 2H, CH_2 -N-(CH_3)₃); 4.01 (m, 4H, CH_2 α); 4.39 (m, 1H, NH). ^{13}C -NMR (125.80 MHz, $CDCl_3$): 14.20 (s, CH_3 myristyl); 19.47 to 19.75 (s, CH_3 phytanyl); 22.63 to 22.73 (s, CH_3 phytanyl); 24.40 to 24.90 (s, CH_2 phytanyl); 25.62 (s, CH_2 lauryl); 29–30 (s, CH phytanyl and CH lauryl); 30.43 (d,

$^2J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 β myristyl); 32.85 (s, CH phytanyl); 36.21 (s, NH- CH_2); 37.36 to 37.48 (s, CH_2 phytanyl); 40.06 (s, CH_2 phytanyl); 54.88 (s, N(CH_3)₃); 65.67 (s, CH_2 α); 66.67 (s, CH_2 -N(CH_3)₃); 67.25 (d, $^2J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 α). ^{31}P -NMR (161.94 MHz, $CDCl_3$): 9.3. IR (cm^{-1}): 3431 (ν_{NH}); 1226 ($\nu_{P=O}$); 973 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $C_{39}H_{84}N_2O_3P$ (M^+): 659.621; found 659.592.

O-Myristyl-*O*-stearyl-*N*-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate **11**. Isolated as a yellow oil (5.35 g; 66% yield). 1H -NMR (400.04 MHz, $CDCl_3$): 0.87 (t, $^3J_{HH} = 8$ Hz, 6H, CH_3); 1.25 (s, 52H, CH_2); 1.64 (m, 4H, CH_2 β); 2.24 (s, 6H, N-(CH_3)₂); 2.41 (t, $^3J_{HH} = 4$ Hz, 2H, CH_2 -N-(CH_3)₂); 2.84 (m, 2H, NH- CH_2); 3.35 (m, 1H, NH); 3.97 (m, 4H, CH_2 α). ^{13}C -NMR (125.80 MHz, $CDCl_3$): 14.13 (s, 2 \times CH_3); 22.71 (s, CH_2); 25.49 (s, CH_2); 29–30 (s, CH_2); 30.43 (d, $^2J_{CP} = 7$ Hz, CH_2 β); 30.87 (s, CH_2); 31.94 (s, CH_2); 38.49 (s, CH_2 -NH); 44.99 (s, N(CH_3)₂); 59.62 (d, $^2J_{CP} = 7$ Hz, CH_2 -N(CH_3)₂); 66.39 (d, $^2J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 α). ^{31}P -NMR (161.94 MHz, $CDCl_3$): 10.7. IR (cm^{-1}): 3190 (ν_{NH}); 1235 ($\nu_{P=O}$); 920 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $C_{36}H_{76}N_2O_3P$ ($M + H$): 617.575; found 617.576.

2-(*O*-Myristyl-*O*-stearylphosphoramidoyl)-ethyltrimethylammonium iodide **12**. Isolated as a yellow powder (0.69 g; 79% yield). 1H -NMR (400.04 MHz, $CDCl_3$): 0.87 (t, $^3J_{HH} = 8$ Hz, 6H, CH_3); 1.24 (s, 52H, CH_2); 1.65 (m, 4H, CH_2 β); 3.47 (s, 9H, N-(CH_3)₃); 3.54 (m, 2H, NH- CH_2); 3.85 (t, $^3J_{HH} = 8$ Hz, 2H, CH_2 -N-(CH_3)₃); 3.99 (m, 4H, CH_2 α); 4.40 (m, 1H, NH). ^{13}C -NMR (125.80 MHz, $CDCl_3$): 14.16 (s, 2 \times CH_3); 22.68 (s, CH_2); 25.58 (s, CH_2); 29–30 (s, CH_2); 30.44 (d, $^2J_{CP} = 10$ Hz, CH_2 β); 31.92 (s, CH_2); 36.21 (NH- CH_2); 54.92 (s, N(CH_3)₃); 66.76 (s, CH_2 -N(CH_3)₃); 67.19 (d, $^2J_{CP} = 12$ Hz, CH_2 α). ^{31}P -NMR (161.94 MHz, $CDCl_3$): 9.4. IR (cm^{-1}): 3312 (ν_{NH}); 1240 ($\nu_{P=O}$); 989 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $C_{37}H_{80}N_2O_3P$ (M^+): 631.590; found 631.549.

O-Oleoyl-*O*-[3-((cholest-5-en-3-yl)oxy)carbonyl]amino]propyl]-*N*-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate **13**. Isolated as a yellow oil (0.80 g; 28% yield). 1H -NMR (400.04 MHz, $CDCl_3$): 0.6–2.0 (m, 41H, CH_2 cholesteryl, CH_2 -CH=CH and CH_2 oleyl); 2.10–2.40 (m, 8H, CH_2 cholesteryl and N-(CH_3)₂); 2.54 (m, 2H, CH_2 -N-(CH_3)₂); 3.05 (m, 2H, NH- CH_2); 3.90–4.10 (m, 4H, CH_2 α); 4.45 (m, 1H, CH cholesteryl); 5.30–5.40 (m, 3H, CH=CH and CH cholesteryl). ^{13}C -NMR (125.80 MHz, $CDCl_3$): 11.86 (s, CH_3); 14.13 (s, CH_3 oleyl); 18.72 (s, CH_3); 19.34 (s, CH_3); 21.05 (s, CH_2); 22.56 (s); 22.69 (s); 22.82 (s); 23.84 (s); 24.29 (s); 25.61; 27.22; 28.00; 28.20; 29–31 (s, CH_2); 31.87 (s, CH); 31.91 (s, CH_2); 35.80 (s, CH); 36.19; 36.56; 37.01; 37.16; 38.34; 38.60; 39.52; 39.75; 42.32; 44.87 (s, N(CH_3)₂); 50.01; 56.14; 56.70; 59.60 (d, $^2J_{CP} = 7$ Hz, CH_2 -N(CH_3)₂); 63.69 (d, $^2J_{CP} = 5$ Hz, CH_2 α); 66.63 (d, $^2J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 α); 74.18; 122.40; 129.77 (s, CH=CH); 129.98 (s, CH=CH); 139.90; 156.30. ^{31}P -NMR (161.94 MHz, $CDCl_3$): 10.6. IR (cm^{-1}): 3331 (ν_{NH}); 1249 ($\nu_{P=O}$); 1034 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $C_{53}H_{98}N_5O_5P$ (M): 888.724; found 888.703.

2-(*O*-Oleoyl-*O*-[3-((cholest-5-en-3-yl)oxy)carbonyl]amino]propyl]-phosphoramidoyl)-ethyltrimethylammonium iodide **14**. Isolated as a yellow oil (0.37 g; 100% yield). 1H -NMR (400.04 MHz, $CDCl_3$): 0.6–2.0 (m, 41H, CH_2 cholesteryl, CH_2 -CH=CH and

CH_2 oleyl); 2.10–2.40 (m, 2H, CH_2 cholesteryl); 3.44 (s, 9H, $N-(CH_3)_3$); 3.60 (m, 2H, $NH-CH_2$); 3.80 (m, 2H, $CH_2-N-(CH_3)_3$); 3.90–4.10 (m, 4H, CH_2 α); 4.45 (m, 1H, CH cholesteryl); 5.30–5.40 (m, 3H, $CH=CH$ and CH cholesteryl). ^{13}C -NMR (125.80 MHz, $CDCl_3$): 11.88 (s, CH_3); 14.15 (s, CH_3 oleyl); 18.74 (s, CH_3); 19.37 (s, CH_3); 21.07 (s, CH_2); 22.58 (s); 22.71 (s); 22.84 (s); 23.88 (s); 24.31 (s); 25.62; 27.26; 28.02; 28.25; 29–31 (s, CH_2); 31.88 (s, CH); 31.93 (s, CH_2); 35.83 (s, CH); 36.21; 36.60; 37.02; 38.64; 39.53; 39.76; 42.34; 50.02; 54.81; 56.18; 56.72; 74.43; 122.51; 129.79 (s, $CH=CH$); 129.99 (s, $CH=CH$); 139.88; 156.45. ^{31}P -NMR (161.94 MHz, $CDCl_3$): 9.6. IR (cm^{-1}): 3348 (ν_{NH}); 1246 ($\nu_{P=O}$); 1011 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $C_{34}H_{101}N_3O_5P$ (M^+): 902.748; found 902.717.

General protocol for the synthesis of cationic lipophosphoramidates with two identical alkyl chains

Synthesis of *O,O*-phytanyl-*N*-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate 19. Method 1 (Atherton-Todd reaction): to a solution of *N,N*-dimethylethylenediamine (0.38 g; 4.27 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) with molecular sieves was added DIPEA (1.10 g; 8.55 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min and then cooled down with an ice water bath. Diphytanylphosphite (2.50 g; 3.89 mmol) and bromotrichloromethane (8.48 g; 42.76 mmol) were then added successively. The reaction mixture was stirred at 0–5 °C for 1 h, and then at room temperature for 5 h. Evaporation of the solvent produced a residue that was dissolved in diethyl ether. Filtration and evaporation of the solvent were performed. The compound was purified by flash chromatography using dichloromethane–methanol as an eluent to produce a yellow oil (22% yield; 0.62 g).

Synthesis of *O,O*-dioleoyl-*N*-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate 17. Method 2: Triethylamine (5.71 mL; 41.1 mmol) was added to a cooled (0 °C) solution of $POCl_3$ (3.00 g; 19.6 mmol) in diethylether (20 mL) and placed under an argon atmosphere. Oleyl alcohol (10.50 g; 39.1 mmol) was slowly added at 0 °C. This solution was further stirred for 5 h while the temperature was slowly increased up to 20 °C. Then, a solution of *N,N*-dimethylethylenediamine (1.72 g; 19.6 mmol) and triethylamine (2.27 mL; 16.3 mmol) in diethylether (5 mL) was added and the solution was stirred for 1 h. Finally, diethylether was added (50 mL) and the solution was washed with brine. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure to produce the desired compound as an oil that was engaged in the next step without any further purification (73% yield; 9.58 g).

Synthesis of 2-(*O,O*-dioleoylphosphoramidoyl)-ethyltrimethylammonium iodide 18. Methyl iodide (5.00 mL) was added to a solution of *O,O*-dioleoyl-*N*-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate 17 (1.0 g; 1.49 mmol; 1 eq.) in 10 mL of CH_2Cl_2 . The mixture was stirred at R.T. overnight. The excess of methyl iodide and CH_2Cl_2 was removed under vacuum. The compound was purified by chromatography on silica gel to give the compound (68% yield; 0.82 g).

***O,O*-Dilauryl-*N*-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate 15.** Isolated as a yellow oil (2.01 g; 55% yield) with method 1.

1H -NMR (400.04 MHz, $CDCl_3$): 0.87 (t, $^3J_{HH} = 8$ Hz, 6H, CH_3); 1.25 (s, 40H, CH_2); 1.66 (m, 4H, CH_2 β); 2.26 (s, 6H, $N-(CH_3)_2$); 2.45 (m, 2H, $CH_2-N-(CH_3)_2$); 3.05 (m, 2H, $NH-CH_2$); 3.97 (m, 4H, CH_2 α). ^{13}C -NMR (125.80 MHz, $CDCl_3$): 14.00 (s, $2 \times CH_3$); 22.58 (s, CH_2); 25.51 (s, CH_2); 29–30 (s, CH_2); 30.31 (d, $^3J_{CP} = 8$ Hz, CH_2 β); 31.82 (s, CH_2); 38.35 (s, CH_2-NH); 44.84 (s, $N(CH_3)_2$); 59.49 (d, $^3J_{CP} = 7$ Hz, $CH_2-N(CH_3)_2$); 66.26 (d, $^2J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 α). ^{31}P -NMR (161.94 MHz, $CDCl_3$): 9.8. IR (cm^{-1}): 3210 (ν_{NH}); 1230 ($\nu_{P=O}$); 987 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $C_{28}H_{62}N_2O_3P$ (M^+); 505.450; found 505.378.

2-(*O,O*-Dilaurylphosphoramidoyl)-ethyltrimethylammonium iodide 16. Isolated as a yellow oil (0.20 g; 78% yield) by following the same experimental protocol than the one used for the synthesis of 18. 1H -NMR (400.04 MHz, $CDCl_3$): 0.87 (t, $^3J_{HH} = 8$ Hz, 6H, CH_3); 1.25 (s, 36H, CH_2); 1.66 (m, 4H, CH_2 β); 3.45 (s, 9H, $N-(CH_3)_3$); 3.60 (m, 2H, $NH-CH_2$); 3.87 (t, $^3J_{HH} = 8$ Hz, 2H, $CH_2-N-(CH_3)_3$); 3.98 (m, 4H, CH_2 α); 4.45 (m, 1H, NH). ^{13}C -NMR (125.80 MHz, $CDCl_3$): 14.16 (s, $2 \times CH_3$); 22.73 (s, CH_2); 25.63 (s, CH_2); 29–30 (s, CH_2); 30.47 (d, $^3J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 β); 31.96 (s, CH_2); 36.58 ($NH-CH_2$); 54.91 (s, $N(CH_3)_3$); 67.06 (s, $CH_2-N(CH_3)_3$); 67.25 (d, $^2J_{CP} = 5$ Hz, CH_2 α). ^{31}P -NMR (161.94 MHz, $CDCl_3$): 9.3. IR (cm^{-1}): 3260 (ν_{NH}); 1225 ($\nu_{P=O}$); 999 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $C_{29}H_{64}N_2O_3P$ (M^+); 519.465; found 519.455.

***O,O*-Dioleoyl-*N*-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate 17.** Isolated as a yellow oil (9.58 g; 73% yield) with method 2. 1H -NMR (400.04 MHz, $CDCl_3$): 0.86 (t, $^3J_{HH} = 8$ Hz, 6H, CH_3); 1.25 (s, 44H, CH_2); 1.63 (m, 4H, CH_2 β); 1.99 (m, 8H, $CH_2-CH=CH$); 2.34 (s, 6H, $N-(CH_3)_2$); 2.55 (t, $^3J_{HH} = 4$ Hz, 2H, $CH_2-N-(CH_3)_2$); 3.05 (m, 2H, $NH-CH_2$); 3.60 (m, 1H, NH); 3.96 (m, 4H, CH_2 α); 5.34 (m, 4H, $CH=CH$). ^{13}C -NMR (125.80 MHz, $CDCl_3$): 14.06 (s, $2 \times CH_3$); 22.64 (s, CH_2); 25.44 (s, CH_2); 27.17 (s, $CH=CH-CH_2$); 29–30 (s, CH_2); 30.40 (d, $^3J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 β); 30.76 (s, CH_2); 31.87 (s, CH_2); 38.13 (s, CH_2-NH); 44.72 (s, $N(CH_3)_2$); 59.62 (d, $^3J_{CP} = 6$ Hz, $CH_2-N(CH_3)_2$); 66.44 (d, $^2J_{CP} = 5$ Hz, CH_2 α); 129.72 (s, $CH=CH$); 129.91 (s, $CH=CH$). ^{31}P -NMR (161.94 MHz, $CDCl_3$): 10.5. IR (cm^{-1}): 1231 ($\nu_{P=O}$); 965 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $C_{40}H_{82}N_2O_3P$ (M^+); 669.606; found 669.590.

2-(*O,O*-Dioleoylphosphoramidoyl)-ethyltrimethylammonium iodide 18. Isolated as a yellow oil (0.82 g; 68% yield) by following the same experimental protocol as the one used for the synthesis of 18. 1H -NMR (400.04 MHz, $CDCl_3$): 0.87 (t, $^3J_{HH} = 8$ Hz, 6H, CH_3); 1.25 (s, 44H, CH_2); 1.65 (m, 4H, CH_2 β); 1.99 (m, 8H, $CH_2-CH=CH$); 3.47 (s, 9H, $N-(CH_3)_3$); 3.55 (m, 2H, $NH-CH_2$); 3.86 (t, $^3J_{HH} = 4$ Hz, 2H, $CH_2-N-(CH_3)_3$); 3.99 (m, 4H, CH_2 α); 4.45 (m, 1H, NH); 5.34 (m, 4H, $CH=CH$). ^{13}C -NMR (125.80 MHz, $CDCl_3$): 14.15 (s, $2 \times CH_3$); 22.71 (s, CH_2); 25.39 (s, CH_2); 27.26 (s, $CH=CH-CH_2$); 29–30 (s, CH_2); 30.41 (d, $^3J_{CP} = 6$ Hz, CH_2 β); 31.93 (s, CH_2); 36.20 (s, CH_2-NH); 55.01 (s, $N(CH_3)_3$); 66.76 (d, $^2J_{CP} = 6$ Hz, $CH_2-N(CH_3)_3$); 67.44 (d, $^2J_{CP} = 5$ Hz, CH_2 α); 129.77 (s, $CH=CH$); 130.11 (s, $CH=CH$). ^{31}P -NMR (161.94 MHz, $CDCl_3$): 8.9. IR (cm^{-1}): 1236 ($\nu_{P=O}$); 970 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $C_{41}H_{84}N_2O_3P$ (M^+); 683.622; found 683.607.

O,O-Phytanyl-N-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate 19. Isolated as a yellow oil (0.62 g; 22% yield) with method 1. ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.87 (m, 30H); 1.00–1.70 (m, 48H, CH₂ phytanyl); 2.59 (s, 6H, N-(CH₃)₂); 2.82 (m, 2H, CH₂-N-(CH₃)₂); 3.24 (m, 2H, NH-CH₂); 4.05 (m, 4H, CH₂ α). ¹³C-NMR (125.80 MHz, CDCl₃): 19.40 to 19.80 (s, CH₃ phytanyl); 22.64 (s, CH₃ phytanyl); 22.73 (s, CH₃ phytanyl); 24.36 (s, CH₂ phytanyl); 24.50 (s, CH₂ phytanyl); 24.81 (s, CH₂ phytanyl); 28.12 (s, CH phytanyl); 29.50 (s, CH phytanyl); 32.80 (s, CH phytanyl); 37.30 to 37.50 (s, CH₂ phytanyl); 38.20 (s, NH-CH₂); 39.38 (s, CH₂ phytanyl); 44.77 (s, N(CH₃)₂); 59.58 (s, CH₂-N(CH₃)₂); 64.86 (d, ²J_{CP} = 5 Hz, CH₂ α). ³¹P-NMR (161.94 MHz, CDCl₃): 10.2. IR (cm⁻¹): 3219 (ν_{NH}); 1229 (ν_{P=O}); 980 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₄₄H₉₄N₂O₃P (M + H): 729.700; found 729.677.

2-(O,O-Diphytanylphosphoramidoyl)-ethyltrimethylammonium iodide 20. Isolated as a yellow oil (0.12 g; 100% yield) by following the same experimental protocol as the one used for the synthesis of 18. ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.87 (m, 30H); 1.00–1.70 (m, 48H, CH₂ phytanyl); 3.46 (s, 9H, N-(CH₃)₃); 3.55 (m, 2H, NH-CH₂); 3.87 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, CH₂-N-(CH₃)₃); 4.02 (m, 4H, CH₂ α); 4.41 (m, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.80 MHz, CDCl₃): 19.40 to 19.80 (s, CH₃ phytanyl); 22.70 to 22.80 (s, CH₃ phytanyl); 24.40 to 24.90 (s, CH₂ phytanyl); 28.02 (s, CH phytanyl); 29.39 (s, CH phytanyl); 32.85 (s, CH phytanyl); 36.57 (s, NH-CH₂); 37.20 to 37.60 (s, CH₂ phytanyl); 39.41 (s, CH₂ phytanyl); 55.01 (s, N(CH₃)₃); 65.74 (d, ²J_{CP} = 5 Hz, CH₂ α); 66.80 (s, CH₂-N(CH₃)₃). ³¹P-NMR (161.94 MHz, CDCl₃): 9.3. IR (cm⁻¹): 3237 (ν_{NH}); 1228 (ν_{P=O}); 973 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₄₅H₉₆N₂O₃P (M⁺): 743.716; found 743.693.

O,O-Dimyristyl-N-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate 21. Isolated as a yellow oil (6.65 g; 91% yield) with method 2. ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.87 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 6H, CH₃); 1.24 (s, 44H, CH₂); 1.66 (m, 4H, CH₂ β); 2.31 (s, 6H, N-(CH₃)₂); 2.50 (m, 2H, CH₂-N-(CH₃)₂); 3.05 (m, 2H, NH-CH₂); 3.97 (m, 4H, CH₂ α). ¹³C-NMR (125.80 MHz, CDCl₃): 14.06 (s, 2 × CH₃); 22.64 (s, CH₂); 25.57 (s, CH₂); 29–30 (s, CH₂); 30.36 (d, ³J_{CP} = 6 Hz, CH₂ β); 31.89 (s, CH₂); 32.83 (s, CH₂); 38.47 (s, CH₂-NH); 44.95 (s, N(CH₃)₂); 59.60 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, CH₂-N(CH₃)₂); 66.30 (d, ²J_{CP} = 5 Hz, CH₂ α). ³¹P-NMR (161.94 MHz, CDCl₃): 10.5. IR (cm⁻¹): 1232 (ν_{P=O}); 990 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₃₂H₇₀N₂O₃P (M + H): 561.512; found 561.512.

2-(O,O-Dimyristylphosphoramidoyl)-ethyltrimethylammonium iodide 22. Isolated as a white powder (0.32 g; 81% yield) by following the same experimental protocol as the one used for the synthesis of 18. ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.88 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 6H, CH₃); 1.25 (s, 44H, CH₂); 1.65 (m, 4H, CH₂ β); 3.45 (s, 9H, N-(CH₃)₃); 3.58 (m, 2H, NH-CH₂); 3.84 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, CH₂-N-(CH₃)₃); 3.98 (m, 4H, CH₂ α). ¹³C-NMR (125.80 MHz, CDCl₃): 14.14 (s, 2 × CH₃); 22.71 (s, CH₂); 25.63 (s, CH₂); 29–30 (s, CH₂); 30.47 (d, ³J_{CP} = 6 Hz, CH₂ β); 31.95 (s, CH₂); 36.38 (s, CH₂-NH); 54.94 (s, N(CH₃)₃); 66.95 (d, ³J_{CP} = 6 Hz, CH₂-N(CH₃)₃); 67.23 (d, ²J_{CP} = 5 Hz, CH₂ α). ³¹P-NMR (161.94 MHz, CDCl₃): 9.4. IR (cm⁻¹): 1240 (ν_{P=O}); 988 (ν_{P-O-C}).

MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₃₃H₇₂N₂O₃P (M⁺): 575.528; found 575.484.

O,O-Stearyl-N-(2-dimethylaminoethyl)phosphoramidate 23. Isolated as a yellow wax (6.86 g; 78% yield) with method 2. ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.87 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 6H, CH₃); 1.25 (s, 60H, CH₂); 1.65 (m, 4H, CH₂ β); 2.26 (s, 6H, N-(CH₃)₂); 2.45 (m, 2H, CH₂-N-(CH₃)₂); 3.05 (m, 2H, NH-CH₂); 3.97 (m, 4H, CH₂ α). ¹³C-NMR (125.80 MHz, CDCl₃): 14.07 (s, 2 × CH₃); 22.66 (s, CH₂); 25.59 (s, CH₂); 29–30 (s, CH₂); 30.38 (d, ³J_{CP} = 7 Hz, CH₂ β); 30.87 (s, CH₂); 31.90 (s, CH₂); 38.27 (s, CH₂-NH); 44.78 (s, N(CH₃)₂); 59.52 (d, ³J_{CP} = 6 Hz, CH₂-N(CH₃)₂); 66.35 (d, ²J_{CP} = 5 Hz, CH₂ α). ³¹P-NMR (161.94 MHz, CDCl₃): 10.7. IR (cm⁻¹): 3300 (ν_{NH}); 1220 (ν_{P=O}); 994 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₄₀H₈₆N₂O₃P (M + H): 673.638; found 673.652.

2-(O,O-Distearylphosphoramidoyl)-ethyltrimethylammonium iodide 24. Isolated as a pale yellow wax (0.45 g; 72% yield) by following the same experimental protocol as the one used for the synthesis of 18. ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.87 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 6H, CH₃); 1.25 (s, 60H, CH₂); 1.65 (m, 4H, CH₂ β); 3.46 (s, 9H, N-(CH₃)₃); 3.56 (m, 2H, NH-CH₂); 3.87 (t, ³J_{HH} = 4 Hz, 2H, CH₂-N-(CH₃)₃); 3.99 (m, 4H, CH₂ α); 4.45 (m, 1H, NH). ¹³C-NMR (125.80 MHz, CDCl₃): 14.14 (s, 2 × CH₃); 22.71 (s, CH₂); 25.60 (s, CH₂); 29–30 (s, CH₂); 30.42 (d, ³J_{CP} = 7 Hz, CH₂ β); 31.95 (s, CH₂); 36.23 (NH-CH₂); 54.92 (s, N(CH₃)₃); 66.78 (s, CH₂-N(CH₃)₃); 67.25 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, CH₂ α). ³¹P-NMR (161.94 MHz, CDCl₃): 9.3. IR (cm⁻¹): 3308 (ν_{NH}); 1240 (ν_{P=O}); 988 (ν_{P-O-C}). MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₄₁H₈₈N₂O₃P (M⁺): 687.653; found 687.622.

Liposomes formulation

The cationic lipids were formulated as a liposomal solution by using hydration of a lipid film. First, an aliquot of a concentrated solution of a desired lipid in chloroform (*e.g.* 2.22 mg, 1.0 mL) was placed in a glass tube and the solvent was evaporated to produce a thin lipid film. Then 1 mL of water was added on this film. After a hydration period (12 h except for compound 20: 2 days) at 4 °C the solution was vortexed (1 min) and sonicated (6 × 10 min) at 45 kHz using a VWR ultrasonic bath. The size and the zeta potential of these formulations were determined for each liposomal solution.

DNA condensation

Liposomal solutions were mixed with pDNA (3.7 kb, pCMV-Luc) as follows: to 1 µg of pDNA in Optimem (Gibco) were added cationic lipids at concentrations corresponding to ± charge ratios (CR) ranging from 1 to 8. These mixtures were incubated for 30 min at RT. The complexes were subjected to electrophoresis in 0.8% agarose gel at 100 V, 90 mA. The gel was stained with ethidium bromide (10 mg mL⁻¹) in order to be thereafter visualized using a UV transilluminator (Fischer Bioblock).

In vitro reporter gene measurements: luciferase assays

Cells were grown in MEM (16HBE, CFBE and SKMel28), or DMEM (A549), supplemented with 10% bovine fetal serum,

1% antibiotic or 0.4% for the SKMel28, and 1% L-glutamine, in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C.

The protocol of the experiments was similar to those previously reported.^{26a} Shortly, cells were seeded 24 h before transfection onto a 24-well plate at a density of 100 000 cells per well and incubated overnight under a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. About 200 µL of a solution of lipoplex was added to each well. Lipofectamine (LFM) was used as a positive control. After 2 h 30 min of incubation at 37 °C, 20 µL of the surrounding was picked up to evaluate the toxicity of each formulation (see below). The culture medium was removed to be replaced with fresh medium. Following a further 48 h incubation at 37 °C, the cells were lysed in order to be assayed for luciferase expression using a chemiluminescent assay (Luciferase Assay System, Promega). The total protein content of the cell lysate was determined using the BC assay kit (Uptima). Data are expressed as relative light units (RLU) per milligram of total proteins (mean ± SD with *n* = 3).

Evaluation of early toxicity

The toxicity of the different lipid–DNA complexes was determined by a chemiluminescent assay (Toxilight – Cambrex, Liège, Belgium). Briefly, this test consists of the measurements of the release of a normally cytoplasmic enzyme (adenylate kinase, AK) from damaged cells into the surrounding medium. The reaction involves two steps. The first one requires the addition of ADP as a substrate for AK. In the presence of AK, the ADP is converted to ATP for assay by bioluminescence. Then, the bioluminescence method utilizes an enzyme Luciferase, which catalyzes the emission of photons from ATP and luciferin. By combining both reactions, the emitted light intensity is directly related to the AK concentration. The relative light units (RLU) are conversely proportional to the intensity of damage induced to the cells consequent to their exposure with the complexes studied. Untransfected cells were used to evaluate the AK background activity indicative of absence of toxicity.

Acknowledgements

This work was supported by grants from “Association Française contre les Myopathies” (Evry, France), “Vaincre La Mucoviscidose” (Paris, France), and “Conseil Régional de Bretagne”. We thank the “Services Communs” of the University of Brest (RMN-RPE and mass spectrometry) and FEDER (Fond européen de développement régional).

Notes and references

- 1 P. L. G. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, M. G. Ringold and M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, **84**, 7413–7417.
- 2 J. P. Behr, B. Demeneix, J. P. Loeffler and J. Perez-Mutul, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1989, **86**, 6982–6986.
- 3 G. Y. Wu and C. H. Wu, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 4429–4432.
- 4 (a) S. Mochizuki, N. Kanegae, K. Nishina, Y. Kamikawa, K. Koivai, H. Masunaga and K. Sakurai, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1828**, 412–418; (b) M. Mével, C. Neveu, C. Gonçalves, J. J. Yaouanc, C. Pichon, P. A. Jaffrès and P. Midoux, *Chem. Commun.*, 2008, 3124–3126.
- 5 W. Gao, J. M. Chan and O. C. Farokhzad, *Mol. Pharm.*, 2010, **7**, 1913–1920.
- 6 (a) X. X. Zhang, T. J. McIntosh and M. W. Grinstaff, *Biochimie*, 2012, **94**, 42–58; (b) A. Fraix, T. Le Gall, M. Berchel, C. Denis, P. Lehn, T. Montier and P. A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 1650–1658.
- 7 P. Yingyuad, M. Mevel, C. Prata, S. Furegati, C. Kontogiorgis, M. Thanou and A. D. Miller, *Bioconjugate Chem.*, 2013, **24**, 343–362.
- 8 S. J. Leung and M. Romanowski, *Theranostics*, 2012, **2**, 1020–1036.
- 9 S. Hernot and A. L. Klibanov, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2008, **60**, 1153–1166.
- 10 D. Zhi, S. Zhang, B. Wang, Y. Zhao, B. Yang and S. Yu, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 563–577.
- 11 (a) M. Berchel, T. Le Gall, H. Couthon-Gourvès, J. P. Haelters, T. Montier, P. Midoux, P. Lehn and P. A. Jaffrès, *Biochimie*, 2012, **94**, 33–41; (b) D. Zhi, S. Zhang, S. Cui, Y. Zhao, Y. Wang and D. Zhao, *Bioconjugate Chem.*, 2013, **24**, 487–519.
- 12 (a) F. Lamarche, M. Mével, T. Montier, L. Burel-Deschamps, P. Giamarchi, R. Tripiet, T. Le Gall, D. Cartier, P. Lehn, J. C. Clément and P. A. Jaffrès, *Bioconjugate Chem.*, 2007, **18**, 1575–1582; (b) M. Mével, T. Montier, F. Lamarche, P. Delépine, T. Le Gall, J. J. Yaouanc, P. A. Jaffrès, D. Cartier, P. Lehn and J. C. Clément, *Bioconjugate Chem.*, 2007, **18**, 1604–1611; (c) M. Mével, G. Breuzard, J. J. Yaouanc, J. C. Clément, P. Lehn, C. Pichon, P. A. Jaffrès and P. Midoux, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 1462–1471; (d) P. Midoux, C. Pichon, J. J. Yaouanc and P. A. Jaffrès, *Br. J. Pharmacol.*, 2009, **157**, 166–178.
- 13 T. Le Gall, D. Loizeau, E. Picquet, N. Carmoy, J. J. Yaouanc, L. Deschamps, P. Delépine, P. Giamarchi, P. A. Jaffrès, P. Lehn and T. Montier, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 1496–1508.
- 14 M. Lindberg, N. Carmoy, T. Le Gall, A. Fraix, M. Berchel, C. Lorilleux, H. Couthon-Gourvès, P. Bellaud, A. Fautrel, P. A. Jaffrès, P. Lehn and T. Montier, *Biomaterials*, 2012, **33**, 6240–6253.
- 15 M. J. Bennett, R. W. Malone and M. H. Nantz, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 2207–2210.
- 16 R. Banerjee, P. K. Das, G. V. Srilakshmi, A. Chaudhuri, N. M. Rao, *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 4292–4299.
- 17 A. Santel, M. Aleku, O. Keil, J. Endruschat, V. Esche, G. Fisch, S. Dames, K. Löffler, M. Fechtner, W. Arnold, K. Giese, A. Klippel and J. Kaufmann, *Gene Ther.*, 2006, **13**, 1222–1234.
- 18 J. G. Hecker, L. L. Hall and V. R. Irion, *Mol. Ther.*, 2001, **3**, 375–384.

Paper

- 19 B. K. Majeti, R. S. Singh, S. K. Yadav, S. R. Bathula, S. Ramakrishna, P. V. Diwan, S. S. Madhavendra and A. Chaudhuri, *Chem. Biol.*, 2004, **11**, 427–437.
- 20 I. Van Der Woude, A. Wagenaar, A. A. P. Meekel, M. B. A. Ter Beest, M. H. J. Ruiters, J. B. F. N. Engberts and D. Hoekstra, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**, 1160–1165.
- 21 J. A. Heyes, D. Niculescu-Duvaz, R. G. Cooper and C. J. Springer, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 99–114.
- 22 R. Koynova, B. Tenchov, L. Wang and R. C. MacDonald, *Mol. Pharm.*, 2009, **6**, 951–958.
- 23 M. H. Nantz, C. W. Dicus, B. Hilliard, S. Yellayi, S. Zou and J. G. Hecker, *Mol. Pharm.*, 2010, **7**, 786–794.
- 24 (a) B. Pitard, N. Oudrhiri, O. Lambert, E. Vivien, C. Masson, B. Wetzler, M. Hauchecorne, D. Scherman, J. L. Rigaud, J. P. Vigneron, J. M. Lehn and P. Lehn, *J. Gene Med.*, 2001, **3**, 478–487; (b) Z. Huang, M. R. Jaafari and F. C. Szoka, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 4146–4149.
- 25 T. Montier, T. Benvegna, P. A. Jaffrès, J. J. Yaouanc and P. Lehn, *Curr. Gene Ther.*, 2008, **8**, 296–312.
- 26 (a) A. Fraix, T. Montier, N. Carmoy, D. Loizeau, L. Burel-Deschamps, T. Le Gall, P. Giamarchi, H. Couthon-Gourvès, J. P. Haelters, P. Lehn and P. A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 2422–2432; (b) A. Fraix, T. Montier, T. Le Gall, C. M. Sevrain, N. Carmoy, M. F. Lindberg, P. Lehn and P. A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 2051–2058.
- 27 A. Durand Dal-Maso, F. Legendre, C. Blonski and P. Hoffmann, *Synth. Commun.*, 2008, **38**, 1688–1693.
- 28 P. R. Hammond, *J. Chem. Soc.*, 1962, 2521–2522.
- 29 (a) R. H. Hall, A. Todd and R. F. Webb, *Nucleotides*, 1957, 3291–3296, *part XXI*; (b) P. J. Garegg, T. Regberg, J. Stawinski and R. Strömberg, *Chem. Scr.*, 1986, **26**, 59–62.
- 30 (a) C. M. Sevrain, J. P. Haelters, A. Chantôme, H. Couthon-Gourvès, A. Girault, C. Vandier and P. A. Jaffrès, *MedChemComm*, 2012, **3**, 1471–1478; (b) C. M. Sevrain, J. P. Haelters, A. Chantôme, H. Couthon-Gourvès, M. Gueguinou, M. Potier-Cartereau, C. Vandier and P. A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 4479–4487; (c) A. Chantôme, M. Potier-Cartereau, L. Clarysse, G. Fromont, S. Marionneau-Lambot, M. Guéguinou, J. C. Pagès, C. Collin, T. Oullier, A. Girault, F. Arbion, J. P. Haelters, P. A. Jaffrès, M. Pinault, P. Besson, V. Joulin, P. Bougnoux and C. Vandier, *Cancer Res.*, 2013, **73**, 4852–4861.
- 31 T. Le Gall, M. Berchel, S. Le Hir, A. Fraix, J. Y. Salaün, C. Férec, P. Lehn, P. A. Jaffrès and T. Montier, *Adv. Healthcare Mater.*, 2013, **2**, 1513–1524.

3 Évaluation de lipophosphates cationiques, une nouvelle famille de lipides cationiques pour le transfert de gènes

Au cours de sa thèse, Stéphanie Le Corre (équipe « Phosphore et vectorisation », CNRS UMR 6521) a également synthétisé des lipophosphates cationiques, une nouvelle famille de lipides cationiques bio-inspirés, pour le transfert de gènes. En effet, au cours de précédents travaux, il a été démontré que la nature de la fonction phosphorée modifiait les propriétés physico-chimiques des vecteurs en terme de fluidité et de fusogénicité [746,747]. L'utilisation de la fonction phosphorée résulte d'un certain nombre de critères qui sont en lien avec les lipoplexes (stabilité des complexes face aux barrières extra et intracellulaires et instabilité des lipoplexes dans les endosomes afin de faciliter la libération de l'ADNp). L'instabilité des complexes dans les endosomes pourrait être favorisée par une coupure chimique (hydrolyse) ou enzymatique (phospholipase) du lipide cationique. Si cette coupure ne se produisait dans l'endosome, elle pourrait faciliter la dégradation de ces vecteurs, qui comme les phospholipides naturels possèdent une fonction phosphate, ce qui pourrait diminuer la toxicité induite par ce type de composés. De plus, les lipophosphates ne possèdent pas de groupe donneur de liaisons hydrogènes (contrairement aux phosphoramides), ce qui pourrait diminuer la stabilité de ces composés après internalisation cellulaire et ainsi favoriser la libération de l'ADNp dans le cytoplasme. Pour cela, des séries de lipides cationiques caractérisés par un groupe fonctionnel phosphate qui agit comme agent de liaison, deux chaînes lipidiques cationiques et une tête polaire, ont été synthétisés. Trois têtes polaires cationiques différentes (N-méthyl imidazolium, pyridinium, et triméthylammonium) et chaînes lipidiques (oléyle et phytanyle) ont été utilisées, afin d'évaluer l'effet de la tête polaire et de la partie grasse sur l'efficacité de transfection des lipides cationiques. Ces nouveaux composés présentaient une bonne stabilité au stockage, sans risques de dégradation constatée après quelques jours dans l'eau ou dans un milieu faiblement acide (pH 5,5). Les essais *in vitro* ont montré que les lipides monocationiques étaient plus efficaces que les lipides dicationiques sur les différentes lignées transfectées. La géométrie particulière de la tête polaire de dérivés dicationiques contribue probablement à leur grande affinité pour l'ADN qui à son tour peut expliquer leur faible efficacité en comparaison avec leur analogues monocationiques, en raison d'une libération moins efficace de l'ADNp dans les cellules. Les dérivés monocationiques sont des candidats prometteurs pour l'évaluation *in vivo* (par injection systémique et/ou aérosolisation) pour le transfert de gènes dans les cellules épithéliales pulmonaires.



Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 1122

Cationic dialkylarylphosphates: a new family of bio-inspired cationic lipids for gene delivery†

Stéphanie S. Le Corre,^a Nawal Belmadi,^b Mathieu Berchel,^{a,c} Tony Le Gall,^{c,b} Jean-Pierre Haelters,^a Pierre Lehn,^b Tristan Montier^{c,b,d,e} and Paul-Alain Jaffrès*^{a,c}

In this work that aims to synthesize and evaluate new cationic lipids as vectors for gene delivery, we report the synthesis of a series of cationic lipids in which a phosphate functional group acts as a linker to assemble on a molecular scale, two lipid chains and one cationic polar head. The mono or dicationic moiety is connected to the phosphate group by an aryl spacer. In this work, two synthesis strategies were evaluated. The first used the Atherton–Todd coupling reaction to introduce a phenolic derivative to dioleoylphosphate. The second strategy used a sequential addition of lipid alcohol and a phenolic derivative on POCl_3 . The two methods are efficient, but the latter allows larger yields. Different polar head groups were introduced, thus producing amphiphilic compounds possessing either one permanent (*N*-methyl-imidazolium, pyridinium, trimethylammonium) or two permanent cationic charges. All these cationic lipids were formulated as liposomal solutions and characterized (size and zeta potential). They formed stable liposomal solutions both in water (at pH 7.0) and in a weakly acidic medium (at pH 5.5). Finally, this new generation of cationic lipids was used to deliver DNA into various human-derived epithelial cells cultured *in vitro*. Compared with Lipofectamine used as a reference commercial lipofection reagent, some cationic dialkylarylphosphates were able to demonstrate potent gene transfer abilities, and noteworthy, monocationic derivatives were much more efficient than dicationic analogues.

Received 18th August 2014,
Accepted 11th November 2014

DOI: 10.1039/c4ob01770f

www.rsc.org/obc

Introduction

Cationic lipids constitute a broad family of synthetic vectors that were first used as gene carriers by Felgner,¹ Behr² and Wu.³ The design of new cationic lipids for nucleic acid delivery aims to identify carriers with high transfection efficacies and reduced toxicity. Interestingly, this type of vector can be readily synthesised according to simple and efficient procedures, which is an important feature with the aim of anticipating the needs of large productions required for *in vivo* experi-

ments. One important parameter, which must be carefully addressed when cationic lipids are used for transfection, is the stability of the supramolecular aggregates (lipoplexes) formed when cationic liposomes are mixed with nucleic acid constructs. Indeed, if robust lipoplexes are required outside the cell, weak supramolecular aggregates are needed after cell internalisation in order to facilitate nucleic acid release from the endosomes. Cationic lipophosphoramidates (Fig. 1A) are an efficient family of synthetic vectors for gene delivery and, noteworthy, cationic polymers possessing this

^aUMR CNRS 6521; SFR ScInBioS, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, Faculté des Sciences, 6 avenue Victor Le Gorgeu, 29238 Brest, France. E-mail: pjaffres@univ-brest.fr

^bUnité INSERM 1078; SFR ScInBioS, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, 22 avenue Camille Desmoulins, 29238 Brest, France

^cIBISA SynNanoVect platform, SFR ScInBioS, Université de Bretagne Occidentale, 29238 Brest Cedex 3, France

^dCHRU de Brest, Service de Génétique moléculaire et de d'Histocompatibilité, 5 avenue du maréchal Foch, 29609 Brest cedex, France

^eDUMG, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, 22 avenue Camille Desmoulins, 29238 Brest, France

†Electronic supplementary information (ESI) available: Supplemental data include zeta and size measurements of liposomal solutions, additional *in vitro* transfection assays and ¹H, ¹³C, ³¹P NMR spectra of mono and dicationic derivatives. See DOI: 10.1039/c4ob01770f

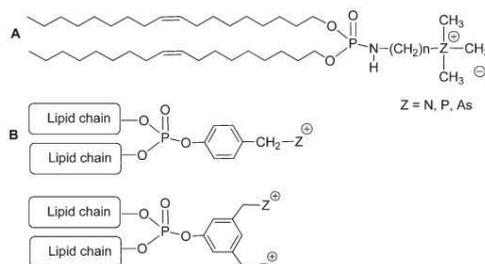


Fig. 1 Chemical structure of cationic lipophosphoramidates (A) and cationic or dicationic dialkylarylphosphates reported in this study (B).

functionality (phosphoramidates) were also designed.⁴ One interesting feature of lipophosphoramidates, in addition to their *in vitro* and *in vivo* gene delivery efficacies,⁵ is their facility of production from readily available lipid building blocks (e.g. dioleoylphosphite). Moreover, structural modifications can be readily implemented to modify the lipid domain,⁶ the polar head group (guanidinium,⁷ trimethylphosphonium or trimethylarsonium⁸) or the phosphorus-based linker (phosphoramidate or thiophosphoramidate⁹). All these possibilities also permitted the introduction of additional functionalities to produce fluorescent carriers (e.g. fluorescent probe),¹⁰ or red/ox sensitive cationic lipids.¹¹ In addition, we observed that some lipophosphoramidates have shown interesting bactericidal action simultaneously with their capacity to transfect eukaryotic cells.¹² In the present work, we have synthesised a new series of cationic lipids possessing a phosphate functional group (dialkyl aryl phosphate; Fig. 1B) that acts as a linker between the hydrophobic domain and the cationic polar region. With cationic lipids possessing an arylphosphate linker, it can be expected to produce less stable lipoplexes (a characteristic that should favour the endosomal escape), when compared to lipophosphoramidates, due to (i) the replacement of the NH group by an oxygen atom that removes a group acting as a hydrogen bond donor, (ii) arylphosphate function being known to be a good leaving group after nucleophilic addition on the phosphorus atom and (iii) the ability of the natural enzymatic system (e.g. phospholipases) to cleave phosphate groups, thus facilitating the catabolism and subsequently the elimination of these cationic lipids after transfection. A recent study reporting the use of phenyl ester of hydroxymethylenediphosphonate as a prodrug indicates that the P–O–Ar bond can be indeed cleaved by phosphodiesterase.¹³ We report herein the synthesis of a series of cationic arylphosphate-based amphiphiles possessing different types of cationic polar head (e.g. trimethylammonium, methylimidazolium, and pyridinium groups). Additionally, the synthesis of dicationic derivatives is also reported. Then, the capacity of these cationic lipids to produce liposomal solutions is studied jointly with the ability of these liposomal solutions to produce lipoplexes after mixing with a plasmid DNA (pDNA). Finally, these new vectors were evaluated as gene carriers in *in vitro* assays and their cytotoxicity was determined.

Results and discussion

The synthesis of cationic lipophosphates reported herein was directly inspired by our previous studies dedicated to the synthesis and use of cationic lipophosphoramidates. We aimed to keep the synthetic scheme unchanged because the lipid building blocks (e.g. dioleoyl phosphite) were readily synthesised. Accordingly, the first step is based on an Atherton–Todd coupling¹⁴ between a selected phosphite and a functional phenol. It is noteworthy that the Atherton–Todd reaction is efficient with phenol whereas it is almost inefficient with alcohol due

to the lower nucleophilicity. Consequently, we used 4-hydroxymethylphenol as the substrate because the alcohol functional group can subsequently be transformed in a suitable functional group that allows the incorporation of a cationic group. To evaluate the stability of the targeting compounds (Fig. 1B) the synthesis was first achieved with diethylphosphite as the starting compound (Fig. 2). The Atherton–Todd reaction was achieved in 62% yield. This modest yield was attributed to the low solubility of 4-hydroxymethylphenol in dichloromethane. After different attempts, the best method consisted of incorporating this compound in its powder form directly in the reaction media. Despite the formation of phosphate as side products, the expected compound was purified by chromatography on silica gel. In all our attempts, the product that would have resulted from the reaction of the alcohol functional group was never detected. Then, compound **1** was engaged in an Appel reaction to produce the expected bromo derivative **2** in high yield. The exchange of the halogen (Finkelstein reaction) to introduce iodide was readily achieved (not shown in Fig. 2), but its replacement was not necessary to produce cationic lipids by reaction with *N*-methylimidazole or pyridine. It must be noted that the aryl group present in compound **3** or **4** may act as a good leaving group, especially due to the presence of the cationic charge at the benzylic position. It can be expected that the stability of this kind of cationic arylphosphate towards nucleophilic species could be influenced by the presence of a cationic group in the benzylic position. In other studies, it was indeed shown that the substitution on triarylphosphate (e.g. tris(*p*-nitrophenyl)phosphate) deeply influenced the rate of hydrolysis at pH 6 or 9.¹⁵ However, other aryldialkylphosphates like some derived from homocampothecin exhibited good stability in water at pH 3 or 7.4.¹⁶ In view of these data from the literature, the stability of compound **3** in water was evaluated. This compound was placed in D₂O and was left at 20 °C for 20 days. NMR spectroscopy assessed its stability under these conditions, meaning that the synthesis of amphiphilic compounds with this motif

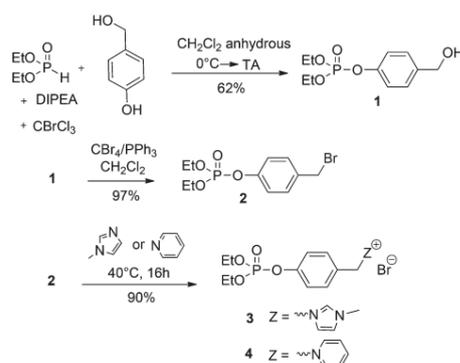


Fig. 2 Synthesis of cationic diethylphosphoramidates via Atherton–Todd reaction.

(dialkylarylphosphate) should have sufficient water stability to prepare liposomal solutions. With more drastic conditions (HEPES buffer at pH 5.5) that aim to mimic the acidity of endosomes, we actually found that the phosphate functional group was kept unaffected after 24 h at either 20 °C or at 37 °C. This result indicated that under these experimental conditions the cationic aryl-dialkyl-lipophosphate exhibited high stability.

The synthesis of the lipophosphate **7**, which is a bis-oleyl analogue of compound **1**, was first attempted using the same synthetic pathway as those reported in Fig. 2. The yield was modest (38%) due to the formation of side products and also, due to the purification step which is more laborious than with compound **1**. However, this reaction can be reproduced and sufficient quantities were isolated (200 mg per batch) for the subsequent synthesis steps (Fig. 3). An alternative method was achieved (method B, Fig. 4), which was based on a recent protocol applied to produce cationic lipids from POCl₃.¹⁷ Herein, two equivalents of oleyl alcohol were first added to POCl₃ in diethylether. The completeness of this step was checked by ³¹P NMR before the addition of dichloromethane and 4-hydroxymethylphenol (powder). After purification, the lipophosphate was isolated in 45% yield. Interestingly, these conditions of reaction were readily applied to produce 1.0 to 2.7 g of the pure phosphate **7**. Finally, a third method was attempted (method C, Fig. 4). Herein, 4-hydroxybenzaldehyde, which is fully soluble in dichloromethane, was engaged in an Atherton-Todd reaction with dioleoylphosphite **5**. The aldehyde **6** was isolated with an excellent yield (97%). The higher solubility of this reagent in dichloromethane but also the higher acidity of the phenol functional group (pK_a = 7 for 4-hydroxybenzaldehyde, whereas the pK_a of 4-hydroxymethylphenol is 15) likely

explained the excellent yields. Interestingly, the nucleophilic addition of the deprotonated phosphite on the aldehyde functional group (Pudovik reaction¹⁸) was never observed. The reduction of the aldehyde functional group with NaBH₄ produced the alcohol **7** with 75% yield. However, the workup of this reaction and the purification of compound **7** with this method were tedious due to the amount of salt present in the reaction media. Altogether the methods A and B were chosen for the production of compound **7** in sufficient quantities to achieve the next steps.

Compound **7** was transformed into the bromo derivative **8** (Appel reaction) in 54% yield (Fig. 3). Before the synthesis of the cationic lipid, a halogen exchange reaction (Finkelstein reaction) can be applied to compound **8** to replace the bromide atom by the iodine atom. This exchange is not necessary for the introduction of the cationic group. Accordingly, the bromo derivative **8** was transformed into the iodo compound **9** (89% yield). Then, three different cationic polar heads were introduced. It can be indeed anticipated that the nature of the cationic polar head can influence the transfection efficacies as previously observed.^{8,19} Herein, the cationic group was either *N*-methylimidazolium (**10**), pyridinium (**11**) or trimethylammonium (**12**).

After the synthesis of monocationic lipophosphates, the procedure was further used to produce dicationic derivatives. It is first important to underline the interest of dicationic amphiphilic compounds for gene transfer experiments. Cationic lipid/DNA complexes are characterized by their charge ratio (CR) which corresponds to the number of positive charges (provided by the cationic lipid) to the number of negative charges (from the nucleic acid). The reduction of the quantities of cationic lipids in a selected formulation may be beneficial, in particular with a view to reduce the potential side effects on the host cells or animals. However, the reduction of the quantities of cationic lipid directly impacts the CR that can, consequently, produce unstable lipoplexes solution (colloidal instability). Accordingly, the use of dicationic²⁰ or polycationic amphiphiles permits to reduce the quantity of cationic lipids while keeping the CR unchanged. This strategy is also valuable for the delivery of genes by aerosolisation or instillation since high quantities of pDNA must be placed in a reduced volume.²¹ The synthesis of dicationic aryl-dialkylphosphates was performed from POCl₃ (Fig. 5) and was inspired by a methodology that we have developed to produce cationic lipids incorporating two different lipid domains.¹⁷ This methodology started by the addition of two equivalents of oleyl alcohol or phytanol followed by the addition of 3,5-dibromomethylphenol. The expected dibromophosphates were isolated with 27% (**14**) and 57% (**15**), respectively, on a 2.5 to 5.7 grams scale. Oleyl^{6b} and phytanyl^{6a} chains were selected as lipid domains on the basis of previous reports that have shown the high transfection efficacies obtained with cationic lipids possessing this type of hydrophobic domain. The halogen exchange was applied only to the oleyl derivatives to produce the bis-iodide derivative **16** (86% yield). Then compound **15** or **16** was mixed with two equivalents of *N*-methylimidazole,

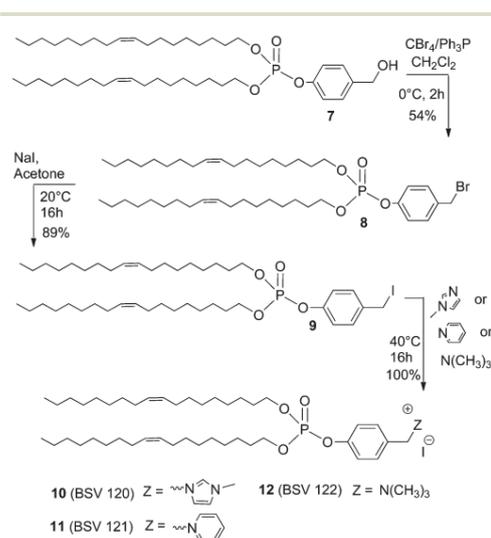


Fig. 3 Synthetic scheme used to produce monocationic aryl-lipophosphates.

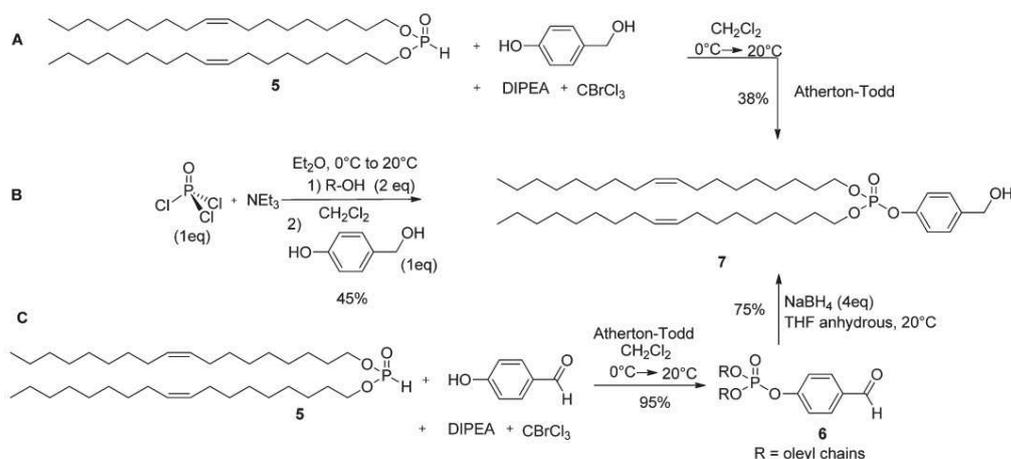


Fig. 4 Synthesis of diolearylphosphate 7 via Atherton-Todd reaction or the POCl₃ procedure.

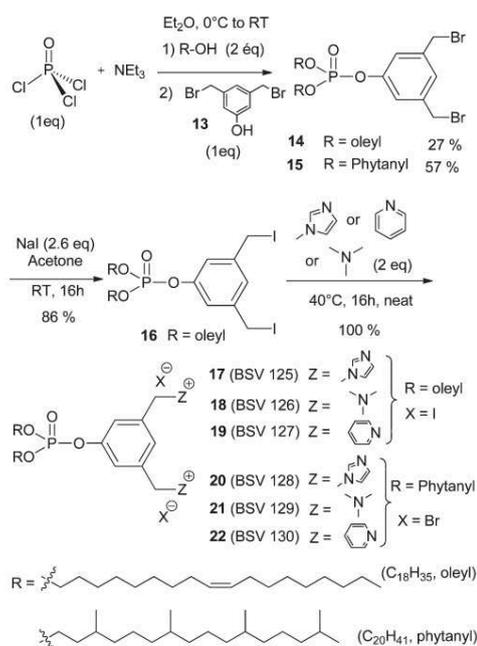


Fig. 5 Synthetic scheme used to produce dicationic aryl-lipophosphates.

pyridine or trimethylamine to produce the dicationic derivatives possessing two oleyl chains (17–19) or two phytanyl chains (20–22). The compounds 17–22 were isolated in sufficient quantities (between 0.12 and 0.23 g) to study their

capacity to condense a pDNA and to conduct gene transfection experiments. The monocationic phosphates 10–12 and 17–22 were formulated as liposomal solutions by hydration of a lipid film (1.5 mmol L⁻¹) in water for 18 h. After mixing (vortex) and sonication, all these mono or dicationic lipids produced liposomal solutions that were thereafter characterized by DLS and zeta measurements (Table SI-1†). The sizes varied from 70 to 250 nm, dicationic derivatives producing smaller particles when compared to monocationic ones. In every instance, the zeta potential was clearly positive, varying from +40 to +50 mV for monocationic derivatives and from +50 to +84 mV for dicationic derivatives.

Next, the ability of monocationic and dicationic lipophosphates to interact with a pDNA was evaluated. First, DNA retardation assays by agarose gel electrophoresis were achieved at different CR, from CR1 to CR8. The results obtained (Fig. SI-2†) showed that the dicationic compounds were able to fully condense DNA from CR2 or CR4 whereas monocationic derivatives were much less efficient, traces of free pDNA being still observed at CR8. With the aim to evaluate the stability of the lipoplexes formed, a dismantling experiment was then carried out, 11 and 19 being used as representative monocationic and dicationic lipophosphates, respectively. For this purpose, lipoplexes formed at CR2, CR4, and CR8 were incubated with increasing quantities of dextran sulfate (DS). In this experiment, DS was used as a counter-poly-anion capable of competing with DNA for electrostatic interaction with the cationic lipids. The dismantling of preformed lipoplexes led to the release of free DNA. By quantifying the recovery of fluorescence on agarose gel, it was thus possible to compare the resistance to dissociation – *i.e.* the stability – of the various lipoplexes considered. This showed that the fluorescence of naked uncomplexed DNA (*i.e.* 100% fluorescence) can be recovered from 11-based lipoplexes incubated with DS at 2 or

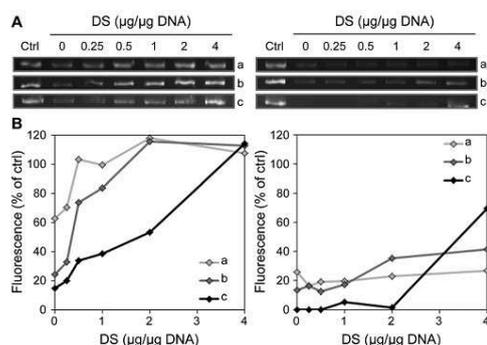


Fig. 6 Ability of a monocationic (**11**, left panels) and a dicationic (**19**, right panels) aryl-lipophosphates to maintain condensed the super-coiled form of a pDNA in presence of dextran sulfate (DS). Agarose gel electrophoresis (A) and quantification of fluorescence intensities (B) for lipoplexes prepared at CR2 (a), CR4 (b), and CR8 (c) incubated at RT with either OptiMEM or OptiMEM containing increasing quantities of DS. Ctrl, naked uncomplexed DNA; its fluorescence intensity is given the value of 100%.

4 $\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$ DNA whereas only residual fluorescence was obtained from **19**-based lipoplexes incubated with DS at the same doses (Fig. 6). Altogether, these results demonstrated that the dicationic lipophosphates are much more efficient than their monocationic analogues both to condense and to retain condensed DNA.

Next, we evaluated the transfection efficacies of monocationic and dicationic derivatives. For this purpose, four human-derived cell lines were used (A549, 16HBE, CFBE, and SKMel28). Lipoplexes were formed at different CR by mixing the various cationic lipids with a luciferase-encoding pDNA. The best results were obtained at CR2 and CR4 (see Fig. 7 and SI-S3†). Each figure summarises the experiments that were realized in triplicate the same day on the same batch of cultured cells. It is first observed that the monocationic amphiphilic compounds (Fig. 7, panel A) are more efficient than the dicationic derivatives (Fig. 7 panels B and C). Among the monocationic compounds, their efficacy is clearly optimum at CR4. The transfection efficacies of compounds **10**, **11** and **12** are actually very close, with a slight advantage to the pyridinium derivative **11**. The dicationic derivatives were 10 to 100 fold less efficient than the monocationic derivatives. In this series of dicationic compounds the lipid chain is either an oleyl (**17–19**) or a phytanyl chain (**20–22**). However, we cannot point out any major difference in transfection efficacies between these two series of compounds. It is hypothesized that the higher compaction property of dicationic derivatives, which is likely explained by the cooperative effect of the two cationic charges, might limit the dissociation of pDNA from the cationic lipid after endocytosis. The lipoplexes dismantling experiment (Fig. 6) and a complementary transfection assay (Fig. SI-4†) support this hypothesis. The geometry of the cationic polar head may also explain this result since we found that linear shaped dicationic lipids produced high transfection

efficacies.²⁰ With respect to the toxicity of this series of compounds (see SI-5†) which was evaluated by the extracellular quantification of a cytosolic enzyme (adenylate kinase), no significant differences were observed between the different cationic lipids, or with the references.

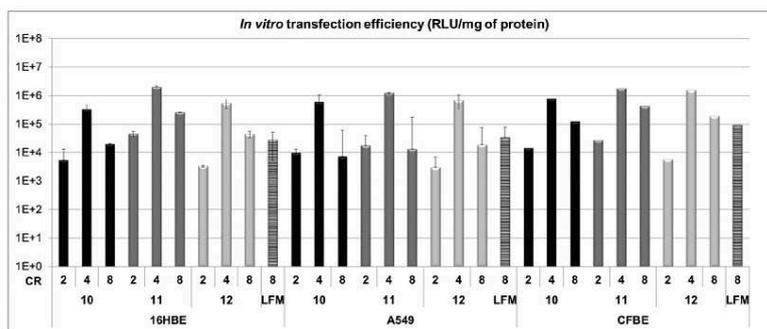
Conclusion

We report herein the synthesis of cationic lipids characterized by a dialkylarylphosphate group that acts as a linker between the hydrophobic domain and the cationic polar head. The access to this type of cationic amphiphile was achieved according to two methods that made use of the Atherton–Todd coupling of lipid-based phosphite with a phenol derivative and a third method that started from POCl_3 . Different cationic polar heads (*N*-methyl imidazolium, pyridinium, and trimethylammonium) and various lipid chains (oleyl or phytanyl) were incorporated into the structure of these new cationic lipids. They were formulated as liposomal solutions. It was first noticed that they exhibited good stability during storage, no degradation being evidenced after a few days in water or in a weakly acidic medium (pH 5.5). Next, the liposomes prepared from these various cationic lipids were tested as vectors for gene delivery into four human-derived cell lines. They demonstrated positive gene transfer abilities, despite great differences in efficiency being observed between all these derivatives. Especially, monocationic derivatives were much more efficient than dicationic lipids. The particular geometry of the polar head of dicationic derivatives likely contributes to their great affinity for DNA that in turn may explain their poor gene delivery potency – as compared with monocationic analogues – due to an inefficient release of DNA inside the cells. The use of the most promising cationic lipophosphates (the monocationic compounds **10**, **11** and **12**) will be tested *in vivo* either by i.v. injection⁶ or by aerosolization with the aim to transfect lung epithelial cells.

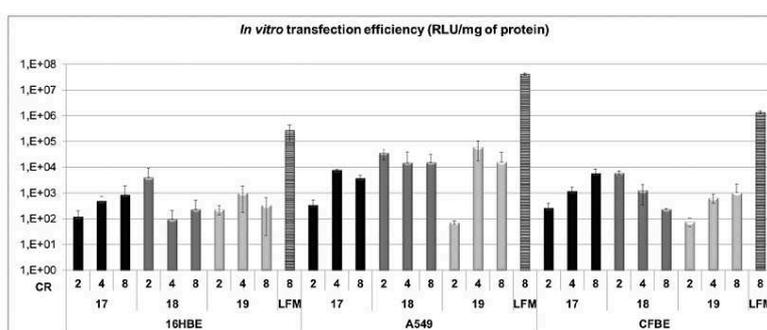
Experimental section

Solvents were dried with a solvent purification system MBraun-SPS (THF, CH_2Cl_2). All compounds were fully characterized by ^1H (500.13 or 400.133 or 300.135 MHz), ^{13}C (125.773 or 75.480 MHz) and ^{31}P (161.970 or 121.498 MHz) NMR spectroscopy (Bruker AC 300, Avance DRX 400 and Avance DRX 500 spectrometers). The lipids were purified by flash chromatography (GRACE REVELERIS Flash Chromatography System) equipped with UV and DLS detectors allowing the attestation of the high purity (>95%) of the purified compounds. Coupling constants J are given in hertz. The following abbreviations were used: s for singlet, d for doublet, t for triplet, q for quadruplet, qt for quintuplet, m for multiplet and dt for doublet of triplets. When needed, ^{13}C and ^{31}P heteronuclear HMQC and HMBC were used to unambiguously establish molecular structures. Mass spectroscopy analyses were performed at Brest (service commun de spectrométrie de masse) on a Bruker

Panel A:



Panel B:



Panel C:

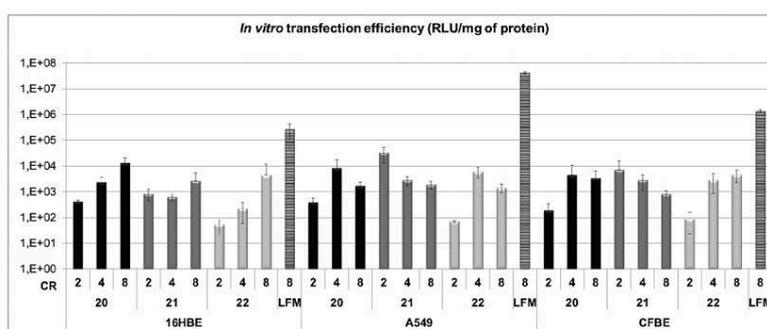


Fig. 7 Transfection efficacies of mono (Panel A) and dicationic dialkylarylphosphates (Panel B and C) as determined using a luciferase-encoding pDNA and three lung cell lines (A549, 16HBE and CFBE). The transfection efficacy is expressed in the unit of RLU mg^{-1} of proteins. LFM, lipofectamine (Invitrogen) ($n = 3$). Untransfected cells and cells exposed to naked (uncomplexed) DNA were used as negative controls.

Autoflex MALDI TOF-TOF III LRF200 CID. Commercial compounds [Oley] alcohol 85%, 2-bromoethylamine hydrobromide] were used as received except DIPEA which was distilled over KOH. *O,O*-Dioleoylphosphite 5²² and 3,5-Bis(bromomethyl)phenol²³ 13 were synthesized according to a reported procedure. The mean particle diameter and zeta potential (ξ) of the liposomes and lipoplexes were measured using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) at 25 °C (see ESI†).

General protocol for the synthesis of dialkyl-arylphosphate from dialkylphosphite

O,O-Diethyl 4-(hydroxymethyl)phenyl phosphate 1. To a solution of 4-hydroxybenzyl alcohol (1.98 g; 15.9 mmol) in CH_2Cl_2 (30 mL) with molecular sieves was added DIPEA (5.61 g; 43.4 mmol). The reaction mixture is stirred at room temperature for 5 min and then cooled down with an ice water bath. Diethylphosphite (2.00 g; 14.5 mmol) and bromotri-

chloromethane (5.74 g; 28.9 mmol) were then added successively. The reaction mixture was stirred at 0–5 °C for 1 h, then at room temperature for 5 h. The evaporation of the solvent produced a residue that was dissolved in diethyl ether. After filtration and evaporation of the solvent, the crude product was purified by flash chromatography using hexane–ethyl acetate as an eluent to produce a yellow oil (2.32 g; 62%). ¹H-NMR (400.08 MHz, CDCl₃): 1.34 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 6H, 2 × O–CH₂–CH₃); 4.21 (m, 4H, 2 × O–CH₂–CH₃); 4.66 (s, 2H, CH₂–OH); 7.19 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, C₂–H and C₆–H); 7.32 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, C₃–H and C₅–H). ¹³C-NMR (125.80 MHz, CDCl₃): 15.55 (d, ³J_{CP} = 6 Hz, 2 × O–CH₂–CH₃); 63.15 (s, CH₂–OH); 64.31 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, 2 × O–CH₂–CH₃); 119.20 (s, C₂ and C₆); 127.72 (s, C₃ and C₅); 138.18 (s, C₄); 149.07 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): –5.1. MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₁₁H₁₈O₅P (M + H): 261.089; found 261.049.

O,O-Diethyl 4-(bromomethyl)phenyl phosphate 2. To the solution of carbon tetrabromide (0.77 g; 2.31 mmol) and diethyl 4-(hydroxymethyl) phenyl phosphate (0.50 g; 1.92 mmol) in 8 mL of CH₂Cl₂ was added triphenylphosphine (0.61 g; 2.31 mmol) at 0 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h. The compound was purified by flash chromatography using hexane–ethyl acetate as an eluent in a yield 97% (0.60 g; 97%). ¹H-NMR (400.08 MHz, CDCl₃): 1.35 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 6H, 2 × O–CH₂–CH₃); 4.21 (m, 4H, 2 × O–CH₂–CH₃); 4.47 (s, 2H, CH₂–Br); 7.19 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, C₂–H and C₆–H); 7.36 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, C₃–H and C₅–H). ¹³C-NMR (100.59 MHz, CDCl₃): 15.88 (d, ³J_{CP} = 6 Hz, 2 × O–CH₂–CH₃); 32.46 (s, CH₂–Br); 64.51 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, 2 × O–CH₂–CH₃); 120.05 (s, C₂ and C₆); 130.33 (s, C₃ and C₅); 134.36 (s, C₄); 150.41 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): –5.3. MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₁₁H₁₇BrO₄P (M + H): 323.005; found 322.979.

{4-[(O,O-Diethylphosphoryl)oxy]phenyl}methylmethyl imidazolium bromide 3. To a solution of diethyl 4-(bromomethyl) phenyl phosphate (0.10 g; 0.31 mmol) was added 1-methylimidazole (25 μL; 0.31 mmol). The reaction mixture is stirred at 40 °C for 15 h (125 mg; 90%). ¹H-NMR (400.08 MHz, CDCl₃): 1.36 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 6H, 2 × O–CH₂–CH₃); 4.02 (s, 3H, CH₃–N); 4.20 (m, 4H, 2 × O–CH₂–CH₃); 5.57 (s, 2H, CH₂–N); 7.24 (m, 4H, C₂–H and C₆–H and N–CH=CH); 7.53 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, C₃–H and C₅–H); 10.57 (s, 1H, CH=N). ¹³C-NMR (100.59 MHz, CDCl₃): 16.10 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, 2 × O–CH₂–CH₃); 36.72 (s, CH₃–N); 52.58 (s, CH₂–N); 64.90 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, 2 × O–CH₂–CH₃); 120.94 (s, C₂ and C₆); 121.71 (s, NCH=CHN); 123.10 (s, NCH=CHN); 129.84 (s, C₄); 130.84 (s, C₃ and C₅); 151.60 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): –5.4.

{4-[(O,O-Diethylphosphoryl)oxy]phenyl}methylpyridinium bromide 4. To a solution of diethyl 4-(bromomethyl)phenyl phosphate (0.10 g; 0.31 mmol) was added pyridine (0.25 mL; 3.09 mmol). The reaction mixture is stirred at 40 °C for 15 h and then evaporated (124 mg; 90%). ¹H-NMR (400.08 MHz, CDCl₃): 1.35 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 6H, 2 × O–CH₂–CH₃); 4.20 (m, 4H, 2 × O–CH₂–CH₃); 6.31 (s, 2H, CH₂–N); 7.20 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, C₂–H and C₆–H); 7.77 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, C₃–H and C₅–H); 7.98 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, H_{pyr}); 8.42 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 1H, H_{pyr}); 9.61 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, H_{pyr}). ¹³C-NMR (100.59 MHz, CDCl₃):

16.12 (d, ³J_{CP} = 6 Hz, 2 × O–CH₂–CH₃); 63.18 (s, CH₂–N); 64.91 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, 2 × O–CH₂–CH₃); 121.26 (s, C₂ and C₆); 128.20 (s, C_{pyr}); 129.69 (s, C₄); 131.62 (s, C₃ and C₅); 145.12 (s, C_{pyr}); 151.98 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): –5.4.

O,O-Dioleil 4-formylphenyl phosphate 6. To a solution of 4-hydroxybenzaldehyde (0.46 g; 3.77 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) with molecular sieves was added DIPEA (1.33 g; 10.29 mmol). The reaction mixture is stirred at room temperature for 5 min and then cooled down with an ice water bath. Dioleilphosphite (2.00 g; 3.43 mmol) and bromotrichloromethane (1.36 g; 6.86 mmol) were then added successively. The reaction mixture was stirred at 0–5 °C for 1 h, then at room temperature for 5 h. Evaporation of the solvent produced a residue that was dissolved in diethyl ether. After filtration of the solution, the solvent was removed in vacuo. The compound was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂–methanol as an eluent to produce a colourless oil (2.29 g; 95% yield). ¹H-NMR (400.08 MHz, CDCl₃): 0.88 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 6H, CH₃); 1.26 (s, 44H, CH₂); 1.69 (m, 4H, CH₂ β); 2.00 (m, 8H, CH₂–CH=CH); 4.15 (m, 4H, CH₂ α); 5.34 (m, 4H, CH=CH); 7.38 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, C₃–H and C₅–H); 7.89 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, C₂–H and C₆–H); 9.97 (s, 1H, CHO). ¹³C-NMR (125.75 MHz, CDCl₃): 14.50 (s, 2 × CH₃); 22.81 (s, CH₂); 25.60 (s, CH₂); 27.13 (s, CH=CH=CH); 29–30 (s, CH₂); 68.94 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, CH₂ α); 120.46 (s, C₂ and C₆); 129.66 (s, CH=CH); 129.95 (s, CH=CH); 131.60 (s, C₃ and C₅); 133.21 (s, C₄); 155.50 (s, C₁); 190.63 (s, CHO). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): –5.6. MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₄₃H₇₅NaO₅P (M + Na): 725.525; found 725.484.

O,O-Dioleil 4-(hydroxymethyl)phenyl phosphate 7. To a solution of 4-hydroxybenzyl alcohol (0.23 g; 1.9 mmol) in CH₂Cl₂ (9 mL) with molecular sieves was added DIPEA (0.66 g; 5.1 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 min and then cooled down with an ice water bath. Dioleil phosphite (1.00 g; 1.7 mmol) and bromotrichloromethane (0.66 g; 3.4 mmol) were then added successively. The reaction mixture was stirred at 0–5 °C for 1 h, and then at room temperature for 5 h. The evaporation of the solvent produced a residue that was dissolved in diethyl ether. After filtration and evaporation of the solvent, the crude product was purified by flash chromatography using CH₂Cl₂–methanol as an eluent to produce a yellow oil (0.45 g; 38%). ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.87 (t, ³J_{HH} = 6 Hz, 6H, CH₃); 1.26 (s, 44H, CH₂); 1.66 (m, 4H, CH₂ β); 1.99 (m, 8H, CH₂–CH=CH); 4.12 (m, 4H, CH₂ α); 4.64 (s, 2H, CH₂–OH); 5.34 (m, 4H, CH=CH); 7.18 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, C₂–H and C₆–H); 7.31 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, C₃–H and C₅–H). ¹³C-NMR (125.75 MHz, CDCl₃): 14.12 (s, 2 × CH₃); 22.70 (s, CH₂); 25.41 (s, CH₂); 27.24 (s, CH=CH–CH₂); 29–30 (s, CH₂); 30.22 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, CH₂ β); 31.93 (s, CH₂); 32.63 (s, CH₂); 64.57 (s, CH₂–OH); 68.65 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, CH₂ α); 115.38 (s, C₂ and C₆); 127.72 (s, C₃ and C₅); 129.56 (s, CH=CH); 129.76 (s, CH=CH); 137.72 (s, C₄); 150.13 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): –4.9. MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₄₃H₇₇NaO₅P (M + Na): 727.541; found 727.514.

O,O-Dioleil 4-(bromomethyl)phenyl phosphate 8. To the solution of carbon tetrabromide (0.42 g; 1.28 mmol) and

dioleil 4-(hydroxymethyl)phenyl phosphate (0.43 g; 0.61 mmol) in 7 mL of CH_2Cl_2 was added triphenylphosphine (0.33 g; 1.28 mmol) at 0 °C. The resulting mixture was stirred for 2 h. The compound was purified by flash chromatography using CH_2Cl_2 -methanol as an eluent in 54% yield (0.25 g; 54%). $^1\text{H-NMR}$ (400.04 MHz, CDCl_3): 0.87 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6$ Hz, 6H, CH_3); 1.26 (s, 44H, CH_2); 1.67 (m, 4H, CH_2 β); 1.99 (m, 8H, CH_2 -CH=CH); 4.12 (m, 4H, CH_2 α); 4.45 (s, 2H, CH_2 -Br); 5.33 (m, 4H, CH=CH); 7.17 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, C_2 -H and C_6 -H); 7.34 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, C_3 -H and C_5 -H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.75 MHz, CDCl_3): 14.14 (s, $2 \times \text{CH}_3$); 22.69 (s, CH_2); 25.38 (s, CH_2); 27.22 (s, CH=CH- CH_2); 29–30 (s, CH_2); 30.24 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 β); 31.86 (s, CH_2 -Br); 32.61 (s, CH_2); 68.67 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 α); 120.31 (s, C_2 and C_6); 129.75 (s, C_3 and C_5); 130.21 (s, CH=CH); 130.47 (s, CH=CH); 134.46 (s, C_4); 150.20 (s, C_1). $^{31}\text{P-NMR}$ (161.97 MHz, CDCl_3): -5.1. MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{76}\text{BrNaO}_4\text{P}$ ($\text{M} + \text{Na}$): 789.456; found 789.598.

O,O-Dioleil 4-(iodomethyl)phenyl phosphate 9. Sodium iodide (76 mg; 0.51 mmol) was added to a solution of dioleil 4-(bromomethyl)phenyl phosphate (300 mg; 0.39 mmol) in 5 mL of acetone. The mixture was stirred at R.T. for 16 h. Acetone was removed. The residue was dissolved in petroleum ether and filtered on celite. The filtrate was concentrated and the expected compound was afforded as a yellow oil (285 mg; 89% yield). $^1\text{H-NMR}$ (400.04 MHz, CDCl_3): 0.88 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 6H, CH_3); 1.26 (s, 44H, CH_2); 1.66 (m, 4H, CH_2 β); 2.00 (m, 8H, CH_2 -CH=CH); 4.12 (m, 4H, CH_2 α); 4.43 (s, 2H, CH_2 -I); 5.35 (m, 4H, CH=CH); 7.13 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, C_2 -H and C_6 -H); 7.34 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, C_3 -H and C_5 -H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.75 MHz, CDCl_3): 4.55 (s, CH_2 -I); 14.16 (s, $2 \times \text{CH}_3$); 22.73 (s, CH_2); 25.43 (s, CH_2); 27.27 (s, CH=CH- CH_2); 29–30 (s, CH_2); 30.27 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7$ Hz, CH_2 β); 31.96 (s, CH_2); 32.66 (s, CH_2); 68.69 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 α); 120.33 (s, C_2 and C_6); 129.79 (s, C_3 and C_5); 130.04 (s, CH=CH); 130.16 (s, CH=CH); 135.99 (s, C_4); 150.23 (s, C_1). $^{31}\text{P-NMR}$ (161.97 MHz, CDCl_3): -5.0. MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{76}\text{INO}_4\text{P}$ ($\text{M} + \text{Na}$): 837.442; found 837.541.

{4-[(O,O-Dioleilphosphoryl)oxy]phenyl}methylmethyl imidazolium iodide 10. To a solution of dioleil 4-(bromomethyl)phenyl phosphate (0.10 g; 0.13 mmol) was added methylimidazole (0.01 mL; 0.13 mmol). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 15 h (110 mg; 100% yield). $^1\text{H-NMR}$ (400.04 MHz, CDCl_3): 0.87 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6$ Hz, 6H, CH_3); 1.26 (s, 44H, CH_2); 1.68 (m, 4H, CH_2 β); 2.00 (m, 8H, CH_2 -CH=CH); 4.04 (s, 3H, CH_3 -N); 4.12 (m, 4H, CH_2 α); 5.34 (m, 4H, CH=CH); 5.58 (s, 2H, CH_2 -N); 7.20 (d, 4H, C_2 -H, C_6 -H and H_{imid}); 7.51 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, C_3 -H and C_5 -H); 10.72 (s, 1H, CH=N). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.75 MHz, CDCl_3): 14.05 (s, $2 \times \text{CH}_3$); 22.70 (s, CH_2); 25.40 (s, CH_2); 27.17 (s, CH=CH- CH_2); 29–30 (s, CH_2); 36.77 (s, CH_3 -N); 52.56 (s, CH_2 -N); 68.84 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 α); 120.92 (s, C_2 and C_6); 121.75 (NCH=CHN); 123.19 (NCH=CHN); 129.74 (s, CH=CH); 129.97 (s, CH=CH); 129.77 (s, C_4); 130.48 (s, C_3 and C_5); 138.01 (s, NCHN); 152.00 (s, C_1). $^{31}\text{P-NMR}$ (161.97 MHz, CDCl_3): -5.1. MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{82}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$ (M^+): 769.601; found 769.530.

{4-[(O,O-Dioleilphosphoryl)oxy]phenyl}methylpyridinium iodide 11. To a solution of dioleil 4-(bromomethyl)phenyl phosphate (0.10 g; 0.13 mmol) was added pyridine (0.10 mL; 1.30 mmol). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 15 h and then evaporated (110 mg; 100% yield). $^1\text{H-NMR}$ (400.04 MHz, CDCl_3): 0.86 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6$ Hz, 6H, CH_3); 1.25 (s, 44H, CH_2); 1.67 (m, 4H, CH_2 β); 1.98 (m, 8H, CH_2 -CH=CH); 4.11 (m, 4H, CH_2 α); 5.32 (m, 4H, CH=CH); 6.37 (s, 2H, CH_2 -N); 7.19 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, C_2 -H and C_6 -H); 7.78 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, C_3 -H and C_5 -H); 7.97 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, H_{pyr}); 8.40 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 1H, H_{pyr}); 9.63 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, H_{pyr}). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.75 MHz, CDCl_3): 14.49 (s, $2 \times \text{CH}_3$); 22.75 (s, CH_2); 25.50 (s, CH_2); 27.17 (s, CH=CH- CH_2); 29–30 (s, CH_2); 62.95 (s, CH_2 -N); 68.85 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 α); 121.11 (s, C_2 and C_6); 128.22 (s, C_3 and C_5); 129.74 (s, CH=CH); 129.98 (s, CH=CH); 131.60 (s, C_3 and C_5); 144.93 (s, C_7 , C_9 and C_{11}); 151.93 (s, C_1). $^{31}\text{P-NMR}$ (161.97 MHz, CDCl_3): -5.0. MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{81}\text{NO}_4\text{P}$ (M^+): 766.590; found 766.508.

{4-[(O,O-Dioleilphosphoryl)oxy]phenyl}methyltrimethyl ammonium iodide 12. To a solution of dioleil 4-(iodomethyl)phenyl phosphate (0.066 g; 0.08 mmol) was added trimethylamine (3.0 mL). The reaction mixture was stirred at RT for 15 h. After evaporation of the volatiles the expected compound 12 was isolated (71 mg; 100% yield). $^1\text{H-NMR}$ (400.04 MHz, CDCl_3): 0.87 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 6H, CH_3); 1.26 (s, 44H, CH_2); 1.69 (m, 4H, CH_2 β); 2.00 (m, 8H, CH_2 -CH=CH); 3.36 (s, 9H, N(CH_3) $_3$); 4.15 (m, 4H, CH_2 α); 5.03 (s, 2H, CH_2 -N); 5.34 (m, 4H, CH=CH); 7.31 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, C_2 -H and C_6 -H); 7.70 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 2H, C_3 -H and C_5 -H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.75 MHz, CDCl_3): 7.29 (s, CH_2 -I); 14.13 (s, $2 \times \text{CH}_3$); 22.69 (s, CH_2); 25.43 (s, CH_2); 27.23 (s, CH=CH- CH_2); 29–30 (s, CH_2); 30.20 (s, CH_2); 31.92 (s, CH_2); 32.62 (s, CH_2); 52.57 (s, N(CH_3) $_3$); 68.69 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6$ Hz, CH_2 α); 120.33 (s, C_2 and C_6); 129.79 (s, C_3 and C_5); 130.04 (s, CH=CH); 130.16 (s, CH=CH); 135.99 (s, C_4); 150.23 (s, C_1). $^{31}\text{P-NMR}$ (161.97 MHz, CDCl_3): -5.3. MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{85}\text{NO}_4\text{P}$ (M^+): 746.621; found 746.586.

O,O-Dioleil-O-[3,5-bis(bromomethyl)phenyl]phosphate 14. Triethylamine (3.13 mL; 22.5 mmol) was added to a cooled (0 °C) solution of POCl_3 (1.64 g; 10.7 mmol) in diethylether (15 mL) and placed under an argon atmosphere. Oleyl alcohol (5.75 g; 21.4 mmol) in diethylether (5 mL) was then added dropwise. This solution was further stirred for 5 h while the temperature was slowly increased up to 20 °C. Then, a solution of 3,5-bis(bromomethyl)phenol (3.00 g; 10.7 mmol) and triethylamine (1.49 mL; 10.7 mmol) in diethylether (8 mL) was added and the solution was stirred for 3 h. After filtration of the solution, the solvent was removed in vacuo. The compound was purified by chromatography on silica gel using CH_2Cl_2 as an eluent to produce a colorless oil (27% yield; 2.47 g). $^1\text{H-NMR}$ (400.04 MHz, CDCl_3): 0.87 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 6H, CH_3); 1.26 (s, 44H, CH_2); 1.68 (m, 4H, CH_2 β); 1.99 (m, 8H, CH_2 -CH=CH); 4.13 (q, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 4H, CH_2 α); 4.42 (s, 4H, CH_2 -Br); 5.34 (m, 4H, CH=CH); 7.20 (s, 2H, C_2 -H and C_6 -H); 7.22 (s, 1H, C_4 -H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.75 MHz, CDCl_3): 14.11 (s, $2 \times \text{CH}_3$); 22.68 (s, CH_2);

25.40 (s, CH₂); 27.22 (s, CH=CH-CH₂); 29–30 (s, CH₂); 30.24 (s, CH₂-Br); 31.90 (s, CH₂); 32.61 (s, CH₂); 68.87 (s, CH₂ α); 120.61 (s, C₂ and C₆); 126.03 (s, C₄); 129.75 (s, CH=CH); 130.00 (s, CH=CH); 140.09 (s, C₃ and C₅); 150.97 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): -5.9.

O,O-Diphtanyl 3,5-bis(bromomethyl)phenyl phosphate 15. Triethylamine (3.13 mL; 22.5 mmol) was added to a cooled (0 °C) solution of POCl₃ (1.64 g; 10.7 mmol) in diethylether (15 mL) and placed under an argon atmosphere. Phytanol (6.40 g; 21.4 mmol) in diethylether (10 mL) was then added dropwise. This solution was further stirred for 5 h while the temperature was slowly increased up to 20 °C. Then, a solution of 3,5-bis(bromomethyl)phenol (3.00 g; 10.7 mmol) and triethylamine (1.49 mL; 10.7 mmol) in diethylether (5 mL) was added and the solution was stirred for 3 h. After filtration of the solution, the solvent was removed in vacuo. The compound was purified by chromatography on silica gel using CH₂Cl₂ as an eluent to produce a colorless oil (57% yield; 5.66 g). ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.87 (m, 30H); 1.00–1.70 (m, 48H, CH₂); 4.17 (m, 4H, CH₂ α); 4.42 (s, 4H, CH₂-Br); 7.19 (s, 2H, C₂-H and C₆-H); 7.22 (s, 1H, C₄-H). ¹³C-NMR (125.80 MHz, CDCl₃): 19.30 to 19.80 (s, CH₃ phytanyl); 22.70 to 22.80 (s, CH₃ phytanyl); 24.30 to 24.90 (s, CH₂ phytanyl); 28.02 (s, CH phytanyl); 29.39 (s, CH phytanyl); 31.85 (s, CH₂-Br); 32.95 (s, CH phytanyl); 37.20 to 37.60 (s, CH₂ phytanyl); 39.41 (s, CH₂ phytanyl); 67.39 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, CH₂ α); 120.11 (s, C₂ and C₆); 126.05 (s, C₄); 140.11 (s, C₃ and C₅); 150.99 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): -5.8. MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₄₈H₈₉Br₂O₄P (M + Na⁺): 641.476; found: 941.474.

O,O-Dioleil 3,5-bis(iodomethyl)phenyl phosphate 16. Sodium iodide (330 mg; 2.2 mmol) was added to a solution of dioleil 3,5-bis(bromomethyl)phenyl phosphate (725 mg; 0.8 mmol) in 10 mL of acetone. The mixture was stirred at R.T. for 16 h. Acetone was removed. The residue was dissolved in ether petroleum and filtered on celite. The filtrate was concentrated and the expected compound was afforded as a yellow oil (86% yield; 0.69 g). ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.87 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 6H, CH₃); 1.26 (s, 44H, CH₂); 1.68 (m, 4H, CH₂ β); 1.99 (m, 8H, CH₂-CH=CH); 4.12 (q, ³J_{HH} = 8 Hz, 4H, CH₂ α); 4.35 (s, 4H, CH₂-I); 5.34 (m, 4H, CH=CH); 7.10 (s, 2H, C₂-H and C₆-H); 7.17 (s, 1H, C₄-H). ¹³C-NMR (125.75 MHz, CDCl₃): 3.44 (s, CH₂-I); 14.14 (s, 2 × CH₃); 22.68 (s, CH₂); 25.41 (s, CH₂); 27.21 (s, CH=CH-CH₂); 29–30 (s, CH₂); 31.94 (s, CH₂); 32.67 (s, CH₂); 68.87 (s, CH₂ α); 119.91 (s, C₂ and C₆); 125.54 (s, C₄); 129.76 (s, CH=CH); 129.98 (s, CH=CH); 141.64 (s, C₃ and C₅); 150.85 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): -5.9.

{3,5-Bis-[(O,O-dioleilphosphoryl)oxy]phenyl}methylmethylimidazolium iodide 17. To a solution of dioleil 3,5-bis(iodomethyl)phenyl phosphate (0.10 g; 0.105 mmol) was added methylimidazole (17 μL; 0.209 mmol). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 15 h (0.12 g; 100% yield). ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.87 (t, ³J_{HH} = 7 Hz, 6H, CH₃); 1.24 (s, 44H, CH₂); 1.68 (m, 4H, CH₂ β); 2.00 (m, 8H, CH₂-CH=CH); 4.00 (s, 6H, CH₃-N); 4.16 (m, 4H, CH₂ α); 5.34 (m, 4H, CH=CH); 5.58 (s, 4H, CH₂-N); 7.32 (s, 2H, NCH=CHN); 7.37 (s, 2H, C₂-H and C₆-H); 7.66 (s, 2H, NCH=CHN); 7.78 (s, 1H,

C₄-H); 10.02 (s, 2H, CH=N). ¹³C-NMR (125.75 MHz, CDCl₃): 14.12 (s, 2 × CH₃); 22.68 (s, CH₂); 25.45 (s, CH₂); 27.22 (s, CH=CH-CH₂); 29–30 (s, CH₂); 31.90 (s, CH₂); 32.61 (s, CH₂); 37.42 (s, CH₃-N); 52.32 (s, CH₂-N); 69.31 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, CH₂ α); 121.24 (s, C₂ and C₆); 122.80 (NCH=CHN); 123.71 (NCH=CHN); 126.38 (s, C₄); 129.72 (s, CH=CH); 130.01 (s, CH=CH); (s, NCHN); 136.13 (s, C₃ and C₅); 151.54 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): -6.1. MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₅₂H₈₉IN₄O₄P (M - I⁻): 991.567; found: 991.472.

{3,5-Bis-[(O,O-dioleilphosphoryl)oxy]phenyl}methyltrimethyl ammonium iodide 18. To a solution of dioleil 3,5-bis(iodomethyl)phenyl phosphate (0.17 g; 0.18 mmol) was added trimethylamine (2.0 mL). The reaction mixture was stirred at RT for 15 h and then evaporated (0.19 g; 100% yield). ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.88 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 6H, CH₃); 1.26 (s, 44H, CH₂); 1.71 (m, 4H, CH₂ β); 2.00 (m, 8H, CH₂-CH=CH); 3.41 (s, 18H, N(CH₃)₃); 4.20 (m, 4H, CH₂ α); 4.99 (s, 4H, CH₂-N); 5.34 (m, 4H, CH=CH); 7.65 (s, 2H, C₂-H and C₆-H); 8.13 (s, 1H, C₄-H). ¹³C-NMR (125.75 MHz, CDCl₃): 14.16 (s, 2 × CH₃); 22.72 (s, CH₂); 25.50 (s, CH₂); 27.27 (s, CH=CH-CH₂); 29–30 (s, CH₂); 31.94 (s, CH₂); 32.67 (s, CH₂); 53.69 (s, N(CH₃)₃); 67.51 (s, CH₂-N); 69.64 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, CH₂ α); 126.97 (s, C₂ and C₆); 129.76 (s, CH=CH); 130.03 (s, CH=CH); 130.49 (s, C₃ and C₅); 134.52 (s, C₄); 151.52 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): -6.0. MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₅₀H₉₅IN₂O₄P (M - I⁻): 945.607; found: 947.590.

{3,5-Bis-[(O,O-dioleilphosphoryl)oxy]phenyl}methylpyridinium iodide 19. To a solution of dioleil 3,5-bis(iodomethyl)phenyl phosphate (0.15 g; mmol) was added pyridine (0.6 mL; 7.38 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 15 h. After evaporation of the volatiles the expected compound **18** was isolated (0.21 g; 100% yield). ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.86 (t, ³J_{HH} = 6 Hz, 6H, CH₃); 1.25 (s, 44H, CH₂); 1.68 (m, 4H, CH₂ β); 1.99 (m, 8H, CH₂-CH=CH); 4.17 (m, 4H, CH₂ α); 5.33 (m, 4H, CH=CH); 6.20 (s, 4H, CH₂-N); 7.53 (s, 2H, C₂-H and C₆-H); 8.12 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 5H, C₄-H and H_{pyr}); 8.51 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, H_{pyr}); 9.62 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 4H, H_{pyr}). ¹³C-NMR (125.75 MHz, CDCl₃): 13.89 (s, 2 × CH₃); 22.40 (s, CH₂); 24.05 (s, CH₂); 26.95 (s, CH=CH-CH₂); 29–30 (s, CH₂); 31.62 (s, CH₂); 32.64 (s, CH₂); 62.34 (s, CH₂-N); 69.05 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, CH₂ α); 121.94 (s, C₂ and C₆); 128.48 (s, C_{pyr}); 129.71 (s, CH=CH); 129.90 (s, CH=CH); 135.96 (s, C₃ and C₅); 145.38 (s, C_{pyr}); 151.40 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): -6.1. MS (MALDI-TOF): *m/z* calcd for C₄₉H₈₂INO₄P⁺ (M - C₆H₇N⁻): 906.502; found: 906.435.

{3,5-Bis-[(O,O-diphtanylphosphoryl)oxy]phenyl}methylmethylimidazolium bromide 20. To a solution of diphtanyl 3,5-bis(bromomethyl)phenyl phosphate (0.20 g; 0.22 mmol) was added methylimidazole (35 μL; 0.43 mmol). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 15 h (230 mg; 100% yield). ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.87 (m, 30H); 1.00–1.70 (m, 48H, CH₂); 4.04 (s, 6H, CH₃-N); 4.18 (m, 4H, CH₂ α); 5.59 (s, 4H, CH₂-N); 7.31 (s, 2H, NCH=CHN); 7.37 (s, 2H, C₂-H and C₆-H); 7.76 (s, 2H, NCH=CHN); 7.79 (s, 1H, C₄-H); 10.03 (s, 2H, CH=N). ¹³C-NMR (125.80 MHz, CDCl₃): 19.20 to 19.70 (s, CH₃ phytanyl); 22.50 to 22.70 (s, CH₃ phytanyl); 24.20 to 24.80

(s, CH₂ phytanyl); 27.89 (s, CH phytanyl); 29.32 (s, CH phytanyl); 32.71 (s, CH phytanyl); 36.90 (s, CH₃-N); 37.20 to 37.40 (s, CH₂ phytanyl); 39.29 (s, CH₂ phytanyl); 51.93 (s, CH₂-N); 67.57 (d, ²J_{CP} = 6 Hz, CH₂ α); 120.53 (s, C₂ and C₆); 122.72 (NCH=CHN); 123.57 (NCH=CHN); 126.25 (s, C₄); 136.48 (s, C₃ and C₅); 139.99 (s, NCHN); 151.39 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): -6.1.

{3,5-Bis-[(O,O-diphytanylphosphoryl)oxy]phenyl)methyl trimethylammonium bromide 21. To a solution of diphytanyl 3,5-bis(bromomethyl)phenyl phosphate (0.17 g; 0.18 mmol) was added trimethylamine (2.0 mL). The reaction mixture was stirred at RT for 15 h and then evaporated (190 mg; 100% yield). ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.87 (m, 30H); 1.00–1.70 (m, 48H, CH₂); 3.46 (s, 18H, N(CH₃)₃); 4.22 (m, 4H, CH₂ α); 5.07 (s, 4H, CH₂-N); 7.65 (s, 2H, C₂-H and C₆-H); 8.19 (s, 1H, C₄-H). ¹³C-NMR (125.75 MHz, CDCl₃): 19.30 to 19.80 (s, CH₃ phytanyl); 22.60 to 22.80 (s, CH₃ phytanyl); 24.30 to 24.90 (s, CH₂ phytanyl); 28.01 (s, CH phytanyl); 29.45 (s, CH phytanyl); 32.84 (s, CH phytanyl); 37.30 to 37.50 (s, CH₂ phytanyl); 39.41 (s, CH₂ phytanyl); 53.41 (s, N-(CH₃)₃); 67.53 (s, CH₂-N); 67.95 (s, CH₂ α); 126.68 (s, C₂ and C₆); 130.52 (s, C₃ and C₅); 134.65 (s, C₄); 151.50 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): -6.0.

{3,5-Bis-[(O,O-diphytanylphosphoryl)oxy]phenyl)methyl pyridinium bromide 22. To a solution of diphytanyl 3,5-bis(bromomethyl)phenyl phosphate (0.20 g; 0.22 mmol) was added pyridine (0.60 mL; 7.38 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 15 h (230 mg; 100% yield). ¹H-NMR (400.04 MHz, CDCl₃): 0.87 (m, 30H); 1.00–1.70 (m, 48H, CH₂ phytanyl); 4.18 (m, 4H, CH₂ α); 6.28 (s, 4H, CH₂-N); 7.59 (s, 2H, C₂-H and C₆-H); 8.12 (t, ³J_{HH} = 7 Hz, 4H, C_b-H and C_d-H); 8.41 (s, 1H, C₄-H); 8.42 (t, ³J_{HH} = 8 Hz, 2H, C_c-H); 9.96 (d, ³J_{HH} = 8 Hz, 4H, C_a-H and C_e-H). ¹³C-NMR (125.75 MHz, CDCl₃): 19.30 to 19.80 (s, CH₃ phytanyl); 22.70 to 22.80 (s, CH₃ phytanyl); 24.40 to 24.90 (s, CH₂ phytanyl); 27.99 (s, CH phytanyl); 29.39 (s, CH phytanyl); 32.82 (s, CH phytanyl); 37.30 to 37.50 (s, CH₂ phytanyl); 39.38 (s, CH₂ phytanyl); 62.65 (s, CH₂ α); 67.85 (s, CH₂-N); 122.14 (s, C₂ and C₆); 128.21 (s, C₄); 128.69 (s, C_b and C_d); 135.65 (s, C₅ and C₃); 145.33 (s, C_a and C_e); 145.76 (s, C_c); 151.70 (s, C₁). ³¹P-NMR (161.97 MHz, CDCl₃): -6.1.

Liposomal formulations

Each cationic lipid was formulated as liposomal solution using the hydration of a lipid film. First, an aliquot of a concentrated solution of a desired lipid in chloroform (e.g. 2, 22 mg, 1.0 mL) was placed in a glass tube and the solvent was evaporated to produce a thin lipid film. Then 1 mL of water was added onto this film. After a hydration period (12 h except for compound 20: 2 days) at 4 °C the solution was vortexed (1 min) and sonicated (6 × 10 min) at 45 kHz using a VWR ultrasonic bath. The size and the zeta potential were determined for each liposomal solution.

DNA condensation and relaxation

The condensation of a pDNA by the various cationic lipids studied was investigated using ethidium bromide intercalation

into DNA. Upon condensation, ethidium bromide is expelled from DNA and thus the fluorescence signal decreases. Conversely, DNA relaxation from the complexes results in recovery of fluorescence. Assays were performed as previously reported.²¹

Cells and culture conditions

Four cell lines were used. A549, bronchial alveolar type II epithelial cells derived from a human pulmonary carcinoma (ATCC No. CCL-185), and SKMel28, human melanoma cells (ATCC No. HTB-72), were obtained from the American Type Culture Collection (USA). 16HBE 14o⁻, human bronchial epithelial cells, and CFBE 41o⁻, cystic fibrosis bronchial epithelial cells, were kindly provided by D. Gruenert, University of Vermont, Burlington, VT, USA.²⁴ They were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, for A549 and SKMel28), or Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, for 16HBE and CFBE), supplemented with 100 units mL⁻¹ penicillin, 100 µg mL⁻¹ streptomycin, 10% heat-inactivated FBS, and incubated at 37 °C, in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. DMEM, EMEM, FBS, penicillin, and streptomycin were purchased from Invitrogen (UK).

In vitro reporter gene measurements: luciferase assays

The protocol of the experiments was similar to those previously reported.^{6a,b} Briefly, cells were seeded 24 h before transfection onto a 24-well plate at a density of 100 000 cells per well and incubated overnight in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. About 200 µL of a solution of lipoplex was added to each well. Lipofectamine (LFM) was used as a positive control. After 2 h 30 min of incubation at 37 °C, 20 µL of the surrounding was picked up to evaluate the toxicity of each formulation (see below). The culture medium was removed to be replaced with fresh medium. Following a further 48 h incubation at 37 °C, the cells were lysed in order to be assayed for luciferase expression using a chemiluminescent assay (Luciferase Assay System, Promega). The total protein content of the cell lysate was determined using the BC assay kit (Uptima). Data are expressed as relative light units (RLU) per milligram of total proteins (mean ± SD with *n* = 3).

Evaluation of early toxicity

The toxicity of the different lipid/DNA complexes was determined using a chemiluminescent assay (Toxilight – Cambrex, Liège, Belgium). Briefly, this test consists of the measurements of the release of a normally cytoplasmic enzyme (adenylate kinase, AK) from damaged cells into the surrounding medium. The reaction involves two steps. The first requires the addition of ADP as a substrate for AK. In the presence of AK, the ADP is converted to ATP for assay by bioluminescence. Then, the bioluminescence method utilizes an luciferase enzyme, which catalyzes the emission of photons from ATP and luciferin. By combining both reactions, the emitted light intensity is directly related to the AK concentration. The relative light units (RLU) are proportional to the damage induced to the cell's membranes, as a consequence of their

Discussion – Conclusions et Perspectives

Discussion – Conclusions et Perspectives

La découverte et le clonage en 1989 du gène en cause dans la mucoviscidose a permis d'envisager de traiter cette maladie génétique récessive par thérapie génique, qui consiste donc à transférer à l'aide d'un vecteur, une version normale du gène CFTR chez les patients. En raison de la gravité des complications pulmonaires, c'est aujourd'hui l'épithélium respiratoire qui constitue le tissu cible du transfert de gènes. Le principe de la thérapie génique, à savoir le transfert d'acides nucléiques pour traiter les maladies génétiques telles que la mucoviscidose, est évidemment très séduisant et un certain nombre d'essais cliniques ont d'ores et déjà été réalisés. Cependant, il reste beaucoup de progrès à faire avant qu'elle devienne un traitement clinique efficace. La majorité des essais cliniques de thérapie génique de la mucoviscidose réalisés jusqu'à présent, ont utilisés des vecteurs viraux. Ces derniers sont certes efficaces mais présentent divers inconvénients, notamment une forte immunogénicité. Les recherches se sont donc orientées vers la mise au point de vecteurs synthétiques obtenus par synthèse chimique. En théorie, les avantages potentiels de ces vecteurs synthétiques par rapport aux vecteurs dérivés des virus sont : (i) absence de limite de taille pour le gène à transférer, (ii) facilité de production et d'utilisation, (iii) faible toxicité et surtout une immunogénicité faible voire absente. Ce dernier avantage étant capital lorsque des administrations répétées sont nécessaires. En effet, la thérapie génique de la mucoviscidose devra être répétée dans le temps en raison du renouvellement permanent des cellules cibles, à moins de parvenir à transfecter un nombre suffisant de cellules souches épithéliales pulmonaires. Les essais précliniques et cliniques antérieurs ont montré que les vecteurs synthétiques ont une efficacité limitée par rapport aux vecteurs viraux, mais suscitent un intérêt lié principalement à leur innocuité, par rapport aux virus recombinants. L'essai clinique « multi-doses » lancé par le consortium britannique de thérapie génique de la mucoviscidose, en utilisant la formulation (pGM169/GL67A/DOEP/DMPE-PEG₅₀₀₀), a conduit à une stabilisation de la fonction pulmonaire des patients traités. Cette étude clinique de phase II a débuté en 2012 en incluant 136 patients. Les résultats montrent une légère amélioration de la fonction respiratoire, allant de 3.7 % à 6.4% pour les patients dont la fonction respiratoire était déjà dégradée. Ces résultats ouvrent la voie à de nouveaux essais avec des doses plus importantes et à des fréquences plus rapprochées. Ces résultats quoique modestes sont prometteurs. En effet, les données rapportées par cet essai constituent la première preuve de concept que l'administration répétée des vecteurs non-viraux dans le cadre

Discussion – Conclusions et Perspectives

de la thérapie génique de la mucoviscidose peut se faire en toute sécurité, sans risque d'engendrer des effets immunogènes indésirables. Certes, des améliorations en termes d'efficacités et des structures des vecteurs et des plasmides sont encore nécessaires. Néanmoins, ces résultats devraient également encourager à continuer à développer des vecteurs non-viraux pour le transfert de gènes.

Ainsi, Le développement de nouveaux vecteurs non-viraux plus efficaces et moins toxiques est un domaine de recherche très actif et en pleine expansion. Les applications des vecteurs synthétiques sont nombreuses, et peuvent s'étendre à d'autres pathologies génétiques et acquises. La principale limite de ce type de vecteurs est sans doute leur faible efficacité, liée principalement aux nombreuses barrières biologiques qui s'opposent à la délivrance du transgène, qui sont de plus voie d'administration – dépendantes. Il est donc primordial d'étudier et de comprendre selon le mode d'administration, les barrières intra et extracellulaires auxquelles doivent faire face les vecteurs synthétiques, afin d'adapter et d'affiner la conception et la formulation de nouveaux vecteurs chimiques. En effet, les propriétés structurales et physicochimiques des vecteurs influent largement sur l'efficacité, la biodistribution et l'élimination des complexes. La nature et la structure du plasmide a par ailleurs autant d'importance que la structure du vecteur utilisé [447,556].

Depuis plusieurs années, notre équipe « Thérapie génique et Transfert de gènes » de l'unité INSERM 1078 travaille en étroite collaboration avec l'équipe « Phosphore et vectorisation » de l'UMR CNRS 6521 à Brest et l'équipe « Chimie Organique et Supramoléculaire » de l'UMR CNRS 6226 à Rennes sur le développement et l'optimisation de vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes. Ainsi, au fil des ans en s'inspirant notamment des lipides membranaires, plusieurs générations de vecteurs ont été développées. Une des questions à laquelle nous nous sommes intéressés au laboratoire au cours de ma thèse, est la biodistribution des vecteurs synthétiques après une administration systémique ou locale. Pour cela, des sondes fluorescentes lipidiques portant un seul fluorochrome localisé au niveau de la tête polaire ont été synthétisées [554]. En effet, le fluorophore a été couplé avec une partie hydrophobe qui peut être associé avec d'autres composés lipidiques. Les composés fluorescents obtenus ont ensuite été formulés en présence du lipophosphoramidate KLN47 (composé de référence du laboratoire) à un rapport molaire de 5 % pour produire des solutions liposomales fluorescentes. De faibles proportions de lipides fluorescents ont été incorporées dans les formulations du KLN47, afin de prévenir les perturbations de l'assemblage supramoléculaire ainsi que les modifications potentielles des propriétés du KLN47 (capacité de transfection, toxicité,...). Différents fluorochromes ont été utilisés (NBD, naphthalimide,

Discussion – Conclusions et Perspectives

cyanine,...) afin de concevoir des lipides possédant des propriétés fluorescentes recouvrant un large spectre de fluorescence, permettant ainsi des applications diverses (in vitro et in vivo). Nous avons montré que le marquage des liposomes avec une sonde fluorescente est une procédure pertinente pour établir les profils de biodistribution des lipoplexes, quelque soit la voie d'administration. Les lipophosphoramidates fluorescents synthétisés présentaient des caractéristiques physicochimiques équivalentes à celles du KLN47. Considérant les mesures de potentiel zêta toutes les formulations avaient une nette charge positive. Néanmoins, la charge de surface était légèrement inférieure pour les formulations fluorescentes (+45 à 50 mV) quelque soit le fluorochrome, par rapport au KLN47 (~ + 60 mV). Ceci est lié probablement à la présence des sondes fluorescentes neutres dans les formulations. La comparaison des lipides fluorescents avec le KLN47 montre de légères variations de taille, en fonction du fluorochrome et du rapport molaire (5 % et 10 %). Globalement, l'addition des sondes fluorescentes lipidiques dans la solution liposomale entraîne une diminution de taille des liposomes par rapport au KLN47, à l'exception des liposomes marqués avec la naphtalimide qui présentaient un diamètre plus élevé. Ces variations de taille sont probablement liées à la nature du fluorochrome et à l'assemblage supramoléculaire des liposomes. Ces résultats ne permettent pas de conclure de façon générale quant à l'effet des sondes fluorescentes lipidiques sur les propriétés physicochimiques du KLN47. Néanmoins, il paraît que l'addition de solutions fluorescentes dans la formulation du KLN47 induit de légères perturbations de l'organisation supramoléculaire des liposomes. Avant toute évaluation in vivo, nous avons d'abord vérifié les capacités de complexation d'ADN et de transfection des liposomes fluorescents. Nous avons ainsi pu montrer que les formulations fluorescentes étaient capables de complexer l'ADN de la même manière que le KLN47. Le marquage des liposomes KLN47 n'affecte donc pas ses capacités de complexation de plasmide. Sur lignées cellulaires, nous avons également pu montrer que les formulations fluorescentes avaient une efficacité de transfection équivalente à celle du KLN47 sur les trois lignées transfectées. Selon le type cellulaire, certaines formulations semblent être plus efficaces que le KLN47. Les composés fluorescents ont une charge de surface moins importante par rapport au KLN47, donc ont moins d'interactions avec les protéines du sérum ce qui pourrait expliquer cette différence d'efficacité. De plus, les formulations testées sont bien tolérées par les cellules. Néanmoins, aux rapports de charge élevés certains, effets toxiques ont été observés. L'ensemble des résultats confirment donc que la présence des sondes fluorescentes lipidiques dans la solution liposomale du KLN47 n'affecte pas ses propriétés transfectantes et n'induit pas de toxicité additionnelle.

Discussion – Conclusions et Perspectives

Concernant les études de biodistribution *in vivo*, nous avons choisi la formulation FL1C contenant le KLN47 de haute concentration (20mg/mL) limitant par conséquent le volume à injecter, et marquée avec la cyanine compatible avec l'utilisation *in vivo*. Lorsque l'on veut réaliser une administration systémique, il est important de stabiliser les complexes par l'ajout du PEG afin de prévenir les risques d'élimination rapide des complexes de la circulation sanguine, en raison de leurs interactions avec les composants du sang et leur capture par les cellules du MPS [584]. Nous avons donc choisi d'injecter aux souris des formulations pégylées et non pégylées afin de faire une étude comparative quant à l'effet du PEG sur la biodistribution des complexes. Grâce aux équipements de biofluorescence, nous avons pu suivre et tracer nos complexes au cours du temps. Les acquisitions ont été réalisées dans différentes positions pour mieux localiser les sites où se concentrent la fluorescence car l'absorption et la diffusion des photons dépendent de la profondeur des tissus. Les résultats ont montré que les complexes (pégylés et non pégylés) présentaient un profil de distribution tissulaire similaire, localisé au niveau des principaux organes (poumons, foie, rate, cœur, reins,...). Cependant, les liposomes et lipoplexes formulés en présence du PEG avaient une biodisponibilité supérieure au cours des 24 heures suivants l'injection en comparaison avec les formulations équivalentes non-pégylées. De plus, les liposomes pégylés avaient une biodisponibilité élevée dans la circulation systémique par rapport aux lipoplexes contenant du PEG. La présence du PEG prolonge le temps de circulation des complexes dans la circulation sanguine et améliore donc leur biodisponibilité. Nos résultats sont en accord avec ceux déjà décrits dans la littérature. En effet, il a été précédemment montré que les complexes pégylés sont restés intacts dans la circulation sanguine pendant trois jours par rapport aux molécules non-pégylées [748]. En ce qui nous concerne, nos produits étaient détectables par BFI pendant environ 20 à 25 jours (données non présentées). Une autre étude avait rapporté que l'ajout du PEG entraîne une diminution de la rétention des lipoplexes dans les organes filtres (poumons, foie et rate) mais également dans les tissus cardiaques chez la souris, et donc une élimination moins rapide des complexes [610]. Les différences de biodistribution observées après administration systémique des complexes est le résultat de plusieurs facteurs, tels que la localisation du fluorochrome dans les complexes, la cinétique de dissociation des complexes dans le milieu et l'affinité des fluorochromes pour les protéines plasmatiques [609]. Il est donc nécessaire d'évaluer le comportement et l'affinité de nos fluorochromes pour les protéines plasmatiques, mais également d'étudier la cinétique de dissociation de nos lipoplexes dans les milieux physiologiques afin de mieux adapter la structure à la voie d'administration. Le type de marquage, les techniques et moyens de révélation ont également

Discussion – Conclusions et Perspectives

toute leur importance, et des différences peuvent donc être observées dans les résultats [608,749].

En parallèle des études de biodistribution, nous avons évalué l'efficacité de transfection de nos lipides cationiques fluorescents 24 heures après injection des complexes. Les images de bioluminescence ont clairement montré une expression du gène rapporteur (luciférase) dans les poumons, pour les lipoplexes pégylés et non pégylés. Ce profil d'expression a déjà été décrit dans la littérature. En effet, lors d'une injection intraveineuse, le transgène s'exprime principalement dans les poumons, alors qu'une grande partie des complexes reste piégée dans le foie et la rate [600–602]. Cependant, la transfection des cellules pulmonaires résulte d'un ciblage passif, les lipoplexes injectés en raison de leur taille importante restent bloqués au niveau des capillaires alvéolaires et engendrent par conséquent un risque d'embolie pulmonaire [503]. Ainsi, l'utilisation de particules de petite taille semble essentielle pour une administration systémique. Cependant, une activité luciférase a été détectée dans le foie des souris traitées essentiellement avec les formulations pégylées, probablement en raison des complexes piégés dans le foie. Il est très probable aussi, que les agrégats formés par les lipoplexes sont hétérogènes, et contiennent donc de très petites particules capables de s'échapper de la microcirculation pulmonaire pour aller dans d'autres organes tels que le foie et la rate. L'efficacité de transfection des lipophosphoramidates fluorescents est du même ordre de grandeur que celle du KLN47 obtenue auparavant par Le Gall et al. [545]. Ceci montre que l'ajout des sondes fluorescentes lipidiques dans la formulation du KLN47 n'affecte pas ses propriétés transfectantes. La quantification de l'expression de la luciférase a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les produits pégylés et non pégylés (expression équivalente). Comme évoqué précédemment, le PEG diminue l'accumulation des complexes dans les organes, et par conséquent, limitent les interactions entre les complexes cationiques et les cellules cibles conduisant à une diminution significative de l'internalisation des complexes aboutissant à des niveaux de transfection très faibles [610]. De plus il a été montré que les motifs PEG présentaient un effet délétère sur la sortie des endosomes aboutissant par conséquent à la dégradation des lipoplexes dans les lysosomes [593,639]. Dans une autre étude, il a été démontré que le taux de relargage des gènes d'intérêt par les complexes pégylés était plus rapide par rapport à celui des particules non pégylés, ce qui entraîne des niveaux d'efficacité similaires [503]. Les récentes études ont montré que le PEG est immunogène [595], son utilisation entraîne la production d'anticorps anti-PEG conduisant à une clairance sanguine accélérée des complexes pégylés après leur réadministration [596], ce qui constitue un obstacle pour la thérapie génique de la mucoviscidose qui nécessite la

Discussion – Conclusions et Perspectives

réadministration des complexes pour maintenir l'effet thérapeutique. Cependant, cet effet immunogène n'a pas été rapporté dans les résultats de l'essai "multi-doses" mené par les britanniques, en utilisant la formulation pGM169/GL67/DOPE/DMPE-PEG₅₀₀₀ [750]. L'efficacité de la pégylation dépend donc largement de nombreux paramètres tels que le PM du PEG, la densité, la conformation et la longueur des chaînes PEG, et la voie d'administration [582]. L'utilisation de ligands de ciblage ou de motifs PEG clivables [588,592], ou du polyglycérol (non immunogène) [597] représentent des alternatives prometteuses au PEG. Dans les conditions testées, les effets secondaires observés suite à l'administration systémique des lipoplexes contenant du PEG sont une toxicité hépatique transitoire, mise en évidence par une augmentation des taux des transaminases hépatiques (AST et ALT). Cette toxicité ne semble pas provenir du plasmide, étant donné que nous avons utilisé un plasmide CpG - free conçu pour réduire ou éliminer l'inflammation induite par la présence des dinucléotides CG non méthylés dans les plasmides [557]. De plus, cette atteinte hépatique a été rapportée par d'autres études en présence ou non du PEG [546,562,617]. Les données histologiques obtenues précédemment dans le laboratoire en utilisant des formulations non pégylés confirment ce profil d'hépatotoxicité transitoire [617]. La présence des sondes fluorescentes lipidiques dans les liposomes du KLN47 n'induit donc pas de toxicité hépatique supplémentaire, étant donné que les niveaux des AST et ALT étaient du même ordre de grandeur dans les deux études. Lors d'une administration intraveineuse, une grande partie des complexes injectés est alors rapidement capturée par les cellules du MPS au niveau du foie et de la rate aboutissant ainsi à leur élimination. L'atteinte hépatique est typique de la voie intraveineuse, puisque dans de précédents travaux, nous n'avons pas observé une augmentation des transaminases hépatiques après transfection par voie intratrachéale. Cependant, l'administration intratrachéale entraîne une expression inégale et hétérogène du transgène, en raison de la faible diffusion des complexes en comparaison avec la voie systémique [566,567]. Ainsi, la voie systémique n'est pas la mieux adaptée lorsque l'on veut réaliser un transfert de gènes à destination des cellules épithéliales pulmonaires, en raison de l'endothélium vasculaire difficilement franchissable et des populations cellulaires que l'on cible. En effet, certaines études soulignent que la correction des cellules épithéliales des voies conductrices serait davantage bénéfique pour les patients [288]. Cependant, il est difficile d'atteindre les cellules épithéliales des voies conductrices par voie systémique en raison de leur localisation. La délivrance de gènes par voie haute (aérosolisation) semble donc la mieux adaptée. Elle présente plusieurs avantages, telles que la diminution des effets secondaires systémiques, l'absence de séquestration des complexes par les protéines du sérum

Discussion – Conclusions et Perspectives

et le foie, l'utilisation de faibles quantités de vecteur, en comparaison avec la voie systémique. De plus, elle induit une distribution plus homogène de l'expression du transgène [565,568,569]. Les perspectives donc consistent en l'évaluation de biodistribution de ses composés fluorescents après aérosolisation. Il est important d'évaluer le comportement de ces molécules face aux forces de cisaillement s'appliquant aux gouttelettes, lors de la nébulisation, et voir ainsi si les lipoplexes conservent leurs propriétés fluorescentes et transfectantes après aérosolisation. Il convient également d'utiliser un plasmide marqué afin d'évaluer la cinétique de dissociation des complexes, et de voir si les complexes et plasmides se colocalisent dans les tissus. En effet, les techniques de biofluorescence (BFI) et de bioluminescence (BLI) sont complémentaires. La BFI apporte des informations quant à la biodistribution et la localisation des complexes, tandis que la BLI apporte des informations sur l'efficacité de la transfection et l'expression finale du transgène. Cependant, nous avons observé que bien que ces complexes puissent être localisés dans un organe (données BFI), leurs caractéristiques physico-chimiques, telles que la pégylation, et la nature du tissu dans lequel ils sont localisés, pourraient limiter leurs capacités de transfection (données BLI). Enfin, les études de biodistribution in situ sont très utiles pour le développement selon la voie d'administration de molécules efficaces, capables de surmonter les barrières biologiques qui limitent leur efficacité. Par ailleurs, le développement de nouveaux modèles animaux (furet et porc) qui sont plus représentatifs du phénotype et des multiples atteintes caractéristiques de la mucoviscidose est très bénéfique pour la thérapie génique de la mucoviscidose, et permettront d'évaluer une large gamme de stratégies de thérapie génique et cellulaire dans des conditions plus proches de la physiopathologie de la maladie. Les thérapies ciblant les canaux régulés par le CFTR (ENaC, CaCC,...), les cellules souches et la réparation génique constituent des perspectives thérapeutiques fort intéressantes.

Références bibliographiques

- [1] J.D. Watson, F.H. Crick, Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*. 171 (1953) 737–738.
- [2] E.S. Lander, L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, et al., International Human Genome Sequencing Consortium, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*. 409 (2001) 860–921. doi:10.1038/35057062.
- [3] T. Friedmann, R. Roblin, Gene Therapy for Human Genetic Disease?, *Science*. 175 (1972) 949–955. doi:10.1126/science.175.4025.949.
- [4] K.B. Kaufmann, H. Büning, A. Galy, A. Schambach, M. Grez, Gene therapy on the move: Gene therapy on the move, *EMBO Mol. Med.* 5 (2013) 1642–1661. doi:10.1002/emmm.201202287.
- [5] S. Mehierhumbert, R. Guy, Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 733–753. doi:10.1016/j.addr.2004.12.007.
- [6] N. Belmadi, Patrick Midoux, Pascal Loyer, Catherine Passirani, Chantal Pichon, Tony Le Gall, et al., Synthetic vectors for gene delivery: An overview of their evolution depending on routes of administration, *Biotechnol. J.* 10 (2015) 1370–1389. doi:10.1002/biot.201400841.
- [7] A.C. Fischer, C.I. Smith, L. Cebotaru, X. Zhang, F.B. Askin, J. Wright, et al., Expression of a truncated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an AAV5-pseudotyped vector in primates, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 15 (2007) 756–763. doi:10.1038/sj.mt.6300059.
- [8] D.R. Gill, S.C. Hyde, Delivery of genes into the CF airway, *Thorax*. 69 (2014) 962–964. doi:10.1136/thoraxjnl-2014-205835.
- [9] F. Alexis, E. Pridgen, L.K. Molnar, O.C. Farokhzad, Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 505–515. doi:10.1021/mp800051m.
- [10] D. Owens III, N. Peppas, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 307 (2006) 93–102. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.
- [11] C. Pichon, C. Gonçalves, P. Midoux, Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53 (2001) 75–94. doi:10.1016/S0169-409X(01)00221-6.
- [12] P. Midoux, C. Pichon, J.-J. Yaouanc, P.-A. Jaffrès, Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers: Histidine-rich nucleic acids carriers, *Br. J. Pharmacol.* 157 (2009) 166–178. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00288.x.
- [13] C.R. Safinya, K.K. Ewert, C. Leal, Cationic liposome–nucleic acid complexes: liquid crystal phases with applications in gene therapy, *Liq. Cryst.* 38 (2011) 1715–1723. doi:10.1080/02678292.2011.624364.
- [14] A. Mesika, A Regulated, NFκB-Assisted Import of Plasmid DNA into Mammalian Cell Nuclei, *Mol. Ther.* 3 (2001) 653–657. doi:10.1006/mthe.2001.0312.
- [15] C. Gonçalves, M.-Y. Ardourel, M. Decoville, G. Breuzard, P. Midoux, B. Hartmann, et al., An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression, *J. Gene Med.* 11 (2009) 401–411. doi:10.1002/jgm.1312.
- [16] L. Pigeon, C. Gonçalves, D. Gosset, C. Pichon, P. Midoux, An E3-14.7K Peptide that Promotes Microtubules-Mediated Transport of Plasmid DNA Increases Polyplexes Transfection Efficiency, *Small*. 9 (2013) 3845–3851. doi:10.1002/smll.201300217.
- [17] S.S. Le Corre, M. Berchel, N. Belmadi, C. Denis, J.-P. Haelters, T. Le Gall, et al., Cationic lipophosphoramidates with two different lipid chains: synthesis and evaluation as gene carriers, *Org. Biomol. Chem.* 12 (2014) 1463–1474. doi:10.1039/c3ob42270d.
- [18] S.S. Le Corre, N. Belmadi, M. Berchel, T. Le Gall, J.-P. Haelters, P. Lehn, et al., Cationic dialkylarylphosphates: a new family of bio-inspired cationic lipids for gene delivery, *Org. Biomol. Chem.* (2014). doi:10.1039/c4ob01770f.

Références Bibliographiques

- [19] M.J. Welsh, A.E. Smith, Cystic fibrosis, *Sci. Am.* 273 (1995) 52–59.
- [20] C. Férec, V. Scotet, J. Beucher, H. Corvol, [Genetics and modifier genes, atypical and rare forms], *Arch. Pédiatrie Organe Off. Société Fr. Pédiatrie.* 19 Suppl 1 (2012) S3–7. doi:10.1016/S0929-693X(12)71099-0.
- [21] <http://www.vaincrelamuco.org/face-la-mucoviscidose/maladie-genetique-rare>, (n.d.).
- [22] A. Munck, M. Roussey, Le dépistage néonatal de la mucoviscidose : stratégie et résultats nationaux, *Arch. Pédiatrie.* 15 (2008) S1–S6. doi:10.1016/S0929-693X(08)73940-X.
- [23] C. Férec, M.P. Audrezet, B. Mercier, H. Guillermit, P. Moullier, I. Quere, et al., Detection of over 98% cystic fibrosis mutations in a Celtic population, *Nat. Genet.* 1 (1992) 188–191. doi:10.1038/ng0692-188.
- [24] G. Fanconi, E. Uehlinger, C. Knauer, Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiektasien, *Wien Med Wschr.* 86 (1936) 753–756.
- [25] F.S. Collins, Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications, *Science.* 256 (1992) 774–779.
- [26] S. Farber, Pancreatic insufficiency and the celiac syndrome., *N Engl J Med.* 229 (1943) 653–682.
- [27] D. Andersen, R. Hodges, Celiac syndrome. V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology., *Am J Dis Child.* 72 (1946) 62–80.
- [28] P.A. Di Sant'agnese, R.C. Darling, G.A. Perera, E. Shea, Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease, *Pediatrics.* 12 (1953) 549–563.
- [29] L.E. Gibson, R.E. Cooke, A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis, *Pediatrics.* 23 (1959) 545–549.
- [30] A.C.V. Mattar, C. Leone, J.C. Rodrigues, F.V. Adde, Sweat conductivity: an accurate diagnostic test for cystic fibrosis?, *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 13 (2014) 528–533. doi:10.1016/j.jcf.2014.01.002.
- [31] M.T. Domingos, N.I.R. Magdalena, M.N.L. Cat, A.M. Watanabe, N.A. Rosário Filho, Sweat conductivity and coulometric quantitative test in neonatal cystic fibrosis screening, *J. Pediatr. (Rio J.).* (2015). doi:10.1016/j.jpmed.2015.03.003.
- [32] P.M. Quinton, J. Bijman, Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis, *N. Engl. J. Med.* 308 (1983) 1185–1189. doi:10.1056/NEJM198305193082002.
- [33] M. Knowles, J. Gatzky, R. Boucher, Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis, *N. Engl. J. Med.* 305 (1981) 1489–1495. doi:10.1056/NEJM198112173052502.
- [34] M.R. Knowles, M.J. Stutts, A. Spock, N. Fischer, J.T. Gatzky, R.C. Boucher, Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium, *Science.* 221 (1983) 1067–1070.
- [35] M. Knowles, J. Gatzky, R. Boucher, Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium, *J. Clin. Invest.* 71 (1983) 1410–1417.
- [36] M.J. Welsh, C.M. Liedtke, Chloride and potassium channels in cystic fibrosis airway epithelia, *Nature.* 322 (1986) 467–470. doi:10.1038/322467a0.
- [37] J.R. Riordan, J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, et al., Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA, *Science.* 245 (1989) 1066–1073.
- [38] B. Kerem, J.M. Rommens, J.A. Buchanan, D. Markiewicz, T.K. Cox, A. Chakravarti, et al., Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis, *Science.* 245 (1989) 1073–1080.
- [39] J.M. Rommens, M.C. Iannuzzi, B. Kerem, M.L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, et al., Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping, *Science.* 245 (1989) 1059–1065.
- [40] S.M. Rowe, S. Miller, E.J. Sorscher, Cystic Fibrosis, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1992–2001. doi:10.1056/NEJMra043184.

Références Bibliographiques

- [41] D.L. Longo, D.A. Stoltz, D.K. Meyerholz, M.J. Welsh, Origins of Cystic Fibrosis Lung Disease, *N. Engl. J. Med.* 372 (2015) 351–362. doi:10.1056/NEJMra1300109.
- [42] J.L. Chou, R. Rozmahel, L.C. Tsui, Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 24471–24476.
- [43] C.J. Ott, N.P. Blackledge, J.L. Kerschner, S.-H. Leir, G.E. Crawford, C.U. Cotton, et al., Intronic enhancers coordinate epithelial-specific looping of the active CFTR locus, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 19934–19939. doi:10.1073/pnas.0900946106.
- [44] J. Koh, T.J. Sferra, F.S. Collins, Characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator promoter region. Chromatin context and tissue-specificity, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 15912–15921.
- [45] K. Yoshimura, H. Nakamura, B.C. Trapnell, W. Dalemans, A. Pavirani, J.P. Lecocq, et al., The cystic fibrosis gene has a “housekeeping”-type promoter and is expressed at low levels in cells of epithelial origin, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 9140–9144.
- [46] D.N. Sheppard, M.J. Welsh, Structure and function of the CFTR chloride channel, *Physiol. Rev.* 79 (1999) S23–45.
- [47] A. Harris, G. Chalkley, S. Goodman, L. Coleman, Expression of the cystic fibrosis gene in human development, *Dev. Camb. Engl.* 113 (1991) 305–310.
- [48] I. Crawford, P.C. Maloney, P.L. Zeitlin, W.B. Guggino, S.C. Hyde, H. Turley, et al., Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 9262–9266.
- [49] J.F. Engelhardt, M. Zepeda, J.A. Cohn, J.R. Yankaskas, J.M. Wilson, Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung, *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 737–749. doi:10.1172/JCI117028.
- [50] S.M. Kreda, M. Mall, A. Mengos, L. Rochelle, J. Yankaskas, J.R. Riordan, et al., Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia, *Mol. Biol. Cell.* 16 (2005) 2154–2167. doi:10.1091/mbc.E04-11-1010.
- [51] T.V. Strong, K. Boehm, F.S. Collins, Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in the human gastrointestinal tract by in situ hybridization, *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 347–354. doi:10.1172/JCI116966.
- [52] <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>, (n.d.).
- [53] S.H. Cheng, R.J. Gregory, J. Marshall, S. Paul, D.W. Souza, G.A. White, et al., Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis, *Cell.* 63 (1990) 827–834.
- [54] F.M. Hantash, J.B. Redman, K. Starn, B. Anderson, A. Buller, M.J. McGinniss, et al., Novel and recurrent rearrangements in the CFTR gene: clinical and laboratory implications for cystic fibrosis screening, *Hum. Genet.* 119 (2006) 126–136. doi:10.1007/s00439-005-0082-0.
- [55] C. Férec, T. Casals, N. Chuzhanova, M. Macek, T. Bienvenu, A. Holubova, et al., Gross genomic rearrangements involving deletions in the CFTR gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms, *Eur. J. Hum. Genet. EJHG.* 14 (2006) 567–576. doi:10.1038/sj.ejhg.5201590.
- [56] J.L. Bobadilla, M. Macek, J.P. Fine, P.M. Farrell, Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening, *Hum. Mutat.* 19 (2002) 575–606. doi:10.1002/humu.10041.
- [57] <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/chromosomallocation.jpg>, (n.d.).
- [58] M.-C. Romey, [Functional characterization of naturally occurring CFTR mutants: interest for cystic fibrosis], *Ann. Biol. Clin. (Paris).* 64 (2006) 429–437.
- [59] T. Montier, D. Frédéric, S. Ravilly, M. Delpéch, P. Lehn, Mucoviscidose : progrès et espoirs, 29 (2010) 56–61.
- [60] H.A. Lewis, C. Wang, X. Zhao, Y. Hamuro, K. Conners, M.C. Kearins, et al., Structure and dynamics of NBD1 from CFTR characterized using crystallography and hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *J. Mol. Biol.* 396 (2010) 406–430. doi:10.1016/j.jmb.2009.11.051.

Références Bibliographiques

- [61] C. Wang, I. Protasevich, Z. Yang, D. Seehausen, T. Skalak, X. Zhao, et al., Integrated biophysical studies implicate partial unfolding of NBD1 of CFTR in the molecular pathogenesis of F508del cystic fibrosis, *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 19 (2010) 1932–1947. doi:10.1002/pro.480.
- [62] P.A. Chong, P.J. Farber, R.M. Vernon, R.P. Hudson, A.K. Mittermaier, J.D. Forman-Kay, Deletion of Phenylalanine-508 in the First Nucleotide Binding Domain of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Increases Conformational Exchange and Inhibits Dimerization, *J. Biol. Chem.* (2015). doi:10.1074/jbc.M115.641134.
- [63] P.H. Thibodeau, C.A. Brautigam, M. Machius, P.J. Thomas, Side chain and backbone contributions of Phe508 to CFTR folding, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12 (2005) 10–16. doi:10.1038/nsmb881.
- [64] G.R. Cutting, L.M. Kasch, B.J. Rosenstein, J. Zielenski, L.C. Tsui, S.E. Antonarakis, et al., A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein, *Nature.* 346 (1990) 366–369. doi:10.1038/346366a0.
- [65] M. Haardt, M. Benharouga, D. Lechardeur, N. Kartner, G.L. Lukacs, C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 21873–21877.
- [66] E.M. Schwiebert, D.J. Benos, M.E. Egan, M.J. Stutts, W.B. Guggino, CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel, *Physiol. Rev.* 79 (1999) S145–166.
- [67] C.M. Farinha, J. King-Underwood, M. Sousa, A.R. Correia, B.J. Henriques, M. Roxo-Rosa, et al., Revertants, low temperature, and correctors reveal the mechanism of F508del-CFTR rescue by VX-809 and suggest multiple agents for full correction, *Chem. Biol.* 20 (2013) 943–955. doi:10.1016/j.chembiol.2013.06.004.
- [68] L. He, P. Kota, A.A. Aleksandrov, L. Cui, T. Jensen, N.V. Dokholyan, et al., Correctors of $\Delta F508$ CFTR restore global conformational maturation without thermally stabilizing the mutant protein, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27 (2013) 536–545. doi:10.1096/fj.12-216119.
- [69] M.D. Amaral, Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients, *J. Intern. Med.* 277 (2015) 155–166. doi:10.1111/joim.12314.
- [70] J.L. Mendoza, P.J. Thomas, Building an understanding of cystic fibrosis on the foundation of ABC transporter structures, *J. Bioenerg. Biomembr.* 39 (2007) 499–505. doi:10.1007/s10863-007-9117-7.
- [71] M. Dean, R. Allikmets, Complete characterization of the human ABC gene family, *J. Bioenerg. Biomembr.* 33 (2001) 475–479.
- [72] K. Hollenstein, R.J.P. Dawson, K.P. Locher, Structure and mechanism of ABC transporter proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17 (2007) 412–418. doi:10.1016/j.sbi.2007.07.003.
- [73] N. Ge, C.N. Muise, X. Gong, P. Linsdell, Direct comparison of the functional roles played by different transmembrane regions in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 55283–55289. doi:10.1074/jbc.M411935200.
- [74] X. Gong, P. Linsdell, Molecular determinants and role of an anion binding site in the external mouth of the CFTR chloride channel pore, *J. Physiol.* 549 (2003) 387–397. doi:10.1113/jphysiol.2002.038232.
- [75] J. Gupta, A. Evagelidis, J.W. Hanrahan, P. Linsdell, Asymmetric structure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore suggested by mutagenesis of the twelfth transmembrane region, *Biochemistry (Mosc.)* 40 (2001) 6620–6627.
- [76] S.S. Smith, X. Liu, Z.R. Zhang, F. Sun, T.E. Kriewall, N.A. McCarty, et al., CFTR: covalent and noncovalent modification suggests a role for fixed charges in anion conduction, *J. Gen. Physiol.* 118 (2001) 407–431.
- [77] C.N.S. Aubin, P. Linsdell, Positive charges at the intracellular mouth of the pore regulate anion conduction in the CFTR chloride channel, *J. Gen. Physiol.* 128 (2006) 535–545. doi:10.1085/jgp.200609516.

Références Bibliographiques

- [78] P. Linsdell, Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel, *Exp. Physiol.* 91 (2006) 123–129. doi:10.1113/expphysiol.2005.031757.
- [79] F. Qian, Y. El Hiani, P. Linsdell, Functional arrangement of the 12th transmembrane region in the CFTR chloride channel pore based on functional investigation of a cysteine-less CFTR variant, *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 462 (2011) 559–571. doi:10.1007/s00424-011-0998-2.
- [80] J.E. Walker, M. Saraste, M.J. Runswick, N.J. Gay, Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold, *EMBO J.* 1 (1982) 945–951.
- [81] I. Callebaut, R. Eudes, J.-P. Mornon, P. Lehn, Nucleotide-binding domains of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: detailed sequence analysis and three-dimensional modeling of the heterodimer, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 61 (2004) 230–242. doi:10.1007/s00018-003-3386-z.
- [82] A.L. Berger, M. Ikuma, M.J. Welsh, Normal gating of CFTR requires ATP binding to both nucleotide-binding domains and hydrolysis at the second nucleotide-binding domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 455–460. doi:10.1073/pnas.0408575102.
- [83] D.C. Gadsby, A.C. Nairn, Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis, *Physiol. Rev.* 79 (1999) S77–S107.
- [84] J.M.R. Baker, R.P. Hudson, V. Kanelis, W.-Y. Choy, P.H. Thibodeau, P.J. Thomas, et al., CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 738–745. doi:10.1038/nsmb1278.
- [85] V. Kanelis, R.P. Hudson, P.H. Thibodeau, P.J. Thomas, J.D. Forman-Kay, NMR evidence for differential phosphorylation-dependent interactions in WT and DeltaF508 CFTR, *EMBO J.* 29 (2010) 263–277. doi:10.1038/emboj.2009.329.
- [86] V. Kanelis, P.A. Chong, J.D. Forman-Kay, NMR spectroscopy to study the dynamics and interactions of CFTR, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 741 (2011) 377–403. doi:10.1007/978-1-61779-117-8_25.
- [87] K.A. Yurko-Mauro, W.W. Reenstra, Prostaglandin F₂α stimulates CFTR activity by PKA- and PKC-dependent phosphorylation, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) C653–660.
- [88] R. Alzamora, J.D. King, K.R. Hallows, CFTR regulation by phosphorylation, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 741 (2011) 471–488. doi:10.1007/978-1-61779-117-8_29.
- [89] J. Xie, L.M. Adams, J. Zhao, T.A. Gerken, P.B. Davis, J. Ma, A short segment of the R domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator contains channel stimulatory and inhibitory activities that are separable by sequence modification, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 23019–23027. doi:10.1074/jbc.M201661200.
- [90] E.A. Pasyk, X.K. Morin, P. Zeman, E. Garami, K. Galley, L.J. Huan, et al., A conserved region of the R domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is important in processing and function, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 31759–31764.
- [91] D.P. Rich, R.J. Gregory, S.H. Cheng, A.E. Smith, M.J. Welsh, Effect of deletion mutations on the function of CFTR chloride channels, *Receptors Channels.* 1 (1993) 221–232.
- [92] O. Baldursson, H.A. Berger, M.J. Welsh, Contribution of R domain phosphoserines to the function of CFTR studied in Fischer rat thyroid epithelia, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279 (2000) L835–841.
- [93] D.J. Wilkinson, T.V. Strong, M.K. Mansoura, D.L. Wood, S.S. Smith, F.S. Collins, et al., CFTR activation: additive effects of stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain, *Am. J. Physiol.* 273 (1997) L127–133.
- [94] B.E. Tildy, D.F. Rogers, Therapeutic options for hydrating airway mucus in cystic fibrosis, *Pharmacology.* 95 (2015) 117–132. doi:10.1159/000377638.
- [95] H.A. Lewis, S.G. Buchanan, S.K. Burley, K. Connors, M. Dickey, M. Dorwart, et al., Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *EMBO J.* 23 (2004) 282–293. doi:10.1038/sj.emboj.7600040.

Références Bibliographiques

- [96] J.-P. Mornon, P. Lehn, I. Callebaut, Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: membrane-spanning domains and coupling interfaces, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 65 (2008) 2594–2612. doi:10.1007/s00018-008-8249-1.
- [97] A.W.R. Serohijos, T. Hegedus, A.A. Aleksandrov, L. He, L. Cui, N.V. Dokholyan, et al., Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 3256–3261. doi:10.1073/pnas.0800254105.
- [98] J.-P. Mornon, P. Lehn, I. Callebaut, Molecular models of the open and closed states of the whole human CFTR protein, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 66 (2009) 3469–3486. doi:10.1007/s00018-009-0133-0.
- [99] O. Kalid, M. Mense, S. Fischman, A. Shitrit, H. Bihler, E. Ben-Zeev, et al., Small molecule correctors of F508del-CFTR discovered by structure-based virtual screening, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 24 (2010) 971–991. doi:10.1007/s10822-010-9390-0.
- [100] J.F. Engelhardt, J.R. Yankaskas, S.A. Ernst, Y. Yang, C.R. Marino, R.C. Boucher, et al., Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus, *Nat. Genet.* 2 (1992) 240–248. doi:10.1038/ng1192-240.
- [101] J. Jacquot, E. Puchelle, J. Hinnrasky, C. Fuchey, C. Bettinger, C. Spilmont, et al., Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway secretory glands, *Eur. Respir. J.* 6 (1993) 169–176.
- [102] J. Johansson, M. Vezzalini, G. Verzè, S. Caldrier, S. Bolognin, M. Buffelli, et al., Detection of CFTR protein in human leukocytes by flow cytometry: Application of Flow Cytometric Analysis to Detect CFTR Expression, *Cytometry A.* 85 (2014) 611–620. doi:10.1002/cyto.a.22456.
- [103] X. Su, M.R. Looney, H.E. Su, J.W. Lee, Y. Song, M.A. Matthay, Role of CFTR expressed by neutrophils in modulating acute lung inflammation and injury in mice, *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al.* 60 (2011) 619–632. doi:10.1007/s00011-011-0313-x.
- [104] R.G. Painter, V.G. Valentine, N.A. Lanson, K. Leidal, Q. Zhang, G. Lombard, et al., CFTR Expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis, *Biochemistry (Mosc.)*. 45 (2006) 10260–10269. doi:10.1021/bi060490t.
- [105] M. Averna, R. Stifanese, R. Grosso, M. Pedrazzi, R. De Tullio, F. Salamino, et al., Role of calpain in the regulation of CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) turnover, *Biochem. J.* 430 (2010) 255–263. doi:10.1042/BJ20100344.
- [106] L.V. Shanshiashvili, N. Dabrundashvili, N. Natsvlishvili, E. Kvaratskhelia, E. Zhuravliova, T. Barbakadze, et al., mGluR1 interacts with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and modulates the secretion of IL-10 in cystic fibrosis peripheral lymphocytes, *Mol. Immunol.* 51 (2012) 310–315. doi:10.1016/j.molimm.2012.03.029.
- [107] C. Sorio, M. Buffelli, C. Angiari, M. Ettorre, J. Johansson, M. Vezzalini, et al., Defective CFTR expression and function are detectable in blood monocytes: development of a new blood test for cystic fibrosis, *PLoS One.* 6 (2011) e22212. doi:10.1371/journal.pone.0022212.
- [108] P.B. Van de Weert-van Leeuwen, M.A. Van Meegen, J.J. Speirs, D.J. Pals, S.H.M. Rooijackers, C.K. Van der Ent, et al., Optimal complement-mediated phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by monocytes is cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49 (2013) 463–470. doi:10.1165/rcmb.2012-0502OC.
- [109] Y. Xu, A. Krause, H. Hamai, B.-G. Harvey, T.S. Worgall, S. Worgall, Proinflammatory phenotype and increased caveolin-1 in alveolar macrophages with silenced CFTR mRNA, *PLoS One.* 5 (2010) e11004. doi:10.1371/journal.pone.0011004.
- [110] A. Di, M.E. Brown, L.V. Deriy, C. Li, F.L. Szeto, Y. Chen, et al., CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 933–944. doi:10.1038/ncb1456.
- [111] P. Del Porto, N. Cifani, S. Guarnieri, E.G. Di Domenico, M.A. Mariggiò, F. Spadaro, et al., Dysfunctional CFTR alters the bactericidal activity of human macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS One.* 6 (2011) e19970. doi:10.1371/journal.pone.0019970.

Références Bibliographiques

- [112] A.A. Aleksandrov, L.A. Aleksandrov, J.R. Riordan, CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel, *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 453 (2007) 693–702. doi:10.1007/s00424-006-0140-z.
- [113] M.P. Anderson, R.J. Gregory, S. Thompson, D.W. Souza, S. Paul, R.C. Mulligan, et al., Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity, *Science*. 253 (1991) 202–205.
- [114] P. Linsdell, J.A. Tabcharani, J.M. Rommens, Y.X. Hou, X.B. Chang, L.C. Tsui, et al., Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions, *J. Gen. Physiol.* 110 (1997) 355–364.
- [115] P. Linsdell, J.W. Hanrahan, Glutathione permeability of CFTR, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) C323–326.
- [116] I. Kogan, M. Ramjeesingh, C. Li, J.F. Kidd, Y. Wang, E.M. Leslie, et al., CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux, *EMBO J.* 22 (2003) 1981–1989. doi:10.1093/emboj/cdg194.
- [117] I.L. Reisin, A.G. Prat, E.H. Abraham, J.F. Amara, R.J. Gregory, D.A. Ausiello, et al., The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 20584–20591.
- [118] V.M. Hudson, Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 1440–1461.
- [119] O. Baldursson, L.S. Ostedgaard, T. Rokhlina, J.F. Cotten, M.J. Welsh, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels with R domain deletions and translocations show phosphorylation-dependent and -independent activity, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 1904–1910. doi:10.1074/jbc.M006934200.
- [120] D. Muallem, P. Vergani, Review. ATP hydrolysis-driven gating in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364 (2009) 247–255. doi:10.1098/rstb.2008.0191.
- [121] L. Csanády, P. Vergani, A. Gulyás-Kovács, D.C. Gadsby, Electrophysiological, biochemical, and bioinformatic methods for studying CFTR channel gating and its regulation, *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. 741 (2011) 443–469. doi:10.1007/978-1-61779-117-8_28.
- [122] J. Bryan, W.H. Vila-Carriles, G. Zhao, A.P. Babenko, L. Aguilar-Bryan, Toward linking structure with function in ATP-sensitive K⁺ channels, *Diabetes*. 53 Suppl 3 (2004) S104–112.
- [123] L.A. Chambers, B.M. Rollins, R. Tarran, Liquid movement across the surface epithelium of large airways, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 159 (2007) 256–270. doi:10.1016/j.resp.2007.06.005.
- [124] S.E. Gabriel, L.L. Clarke, R.C. Boucher, M.J. Stutts, CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship, *Nature*. 363 (1993) 263–268. doi:10.1038/363263a0.
- [125] E.M. Schwiebert, M.E. Egan, T.H. Hwang, S.B. Fulmer, S.S. Allen, G.R. Cutting, et al., CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP, *Cell*. 81 (1995) 1063–1073.
- [126] M. Julien, B. Verrier, M. Cerutti, V. Chappe, M. Gola, G. Devauchelle, et al., Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) confers glibenclamide sensitivity to outwardly rectifying chloride channel (ORCC) in Hi-5 insect cells, *J. Membr. Biol.* 168 (1999) 229–239.
- [127] C.A. Hobbs, C. Da Tan, R. Tarran, Does epithelial sodium channel hyperactivity contribute to cystic fibrosis lung disease?, *J. Physiol.* 591 (2013) 4377–4387. doi:10.1113/jphysiol.2012.240861.
- [128] M.J. Stutts, C.M. Canessa, J.C. Olsen, M. Hamrick, J.A. Cohn, B.C. Rossier, et al., CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels, *Science*. 269 (1995) 847–850.
- [129] I.I. Ismailov, M.S. Awayda, B. Jovov, B.K. Berdiev, C.M. Fuller, J.R. Dedman, et al., Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 4725–4732.

Références Bibliographiques

- [130] C.M. McNicholas, M.W. Nason, W.B. Guggino, E.M. Schwiebert, S.C. Hebert, G. Giebisch, et al., A functional CFTR-NBF1 is required for ROMK2-CFTR interaction, *Am. J. Physiol.* 273 (1997) F843–848.
- [131] H.A. Berger, M.J. Welsh, Electrolyte transport in the lungs, *Hosp. Pract. Off. Ed.* 26 (1991) 53–59.
- [132] D.L. O'Donoghue, V. Dua, G.W.J. Moss, P. Vergani, Increased apical Na⁺ permeability in cystic fibrosis is supported by a quantitative model of epithelial ion transport: Model of ion transport in CF and non-CF nasal epithelia, *J. Physiol.* 591 (2013) 3681–3692. doi:10.1113/jphysiol.2013.253955.
- [133] C.A. Wagner, M. Ott, K. Klingel, S. Beck, J. Melzig, B. Friedrich, et al., Effects of the serine/threonine kinase SGK1 on the epithelial Na⁽⁺⁾ channel (ENaC) and CFTR: implications for cystic fibrosis, *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 11 (2001) 209–218. doi:51935.
- [134] K. Kunzelmann, G.L. Kiser, R. Schreiber, J.R. Riordan, Inhibition of epithelial Na⁺ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *FEBS Lett.* 400 (1997) 341–344.
- [135] H.L. Ji, M.L. Chalfant, B. Jovov, J.P. Lockhart, S.B. Parker, C.M. Fuller, et al., The cytosolic termini of the beta- and gamma-ENaC subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 27947–27956. doi:10.1074/jbc.M002848200.
- [136] G. Nagel, T. Szellas, J.R. Riordan, T. Friedrich, K. Hartung, Non-specific activation of the epithelial sodium channel by the CFTR chloride channel, *EMBO Rep.* 2 (2001) 249–254. doi:10.1093/embo-reports/kve045.
- [137] R. Coakley, M. Stutts, Function of CFTR protein: regulatory functions, *Prog Respir Res. Basel, Karger.* 34 (2006) 45–53.
- [138] N.A. Bradbury, R.J. Bridges, Regulated membrane vesicle trafficking: a defect in cystic fibrosis corrected by gene transfer, *Biochem. Soc. Trans.* 20 (1992) 124S.
- [139] N.A. Bradbury, T. Jilling, G. Berta, E.J. Sorscher, R.J. Bridges, K.L. Kirk, Regulation of plasma membrane recycling by CFTR, *Science.* 256 (1992) 530–532.
- [140] A. Bouter, C. Gounou, R. Bérat, S. Tan, B. Gallois, T. Granier, et al., Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair, *Nat. Commun.* 2 (2011) 270. doi:10.1038/ncomms1270.
- [141] P. Trouvé, M.-A. Le Drévo, M. Kerbirou, G. Friocourt, Y. Fichou, D. Gillet, et al., Annexin V is directly involved in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator's chloride channel function, *Biochim. Biophys. Acta.* 1772 (2007) 1121–1133. doi:10.1016/j.bbadis.2007.06.006.
- [142] J. Barasch, B. Kiss, A. Prince, L. Saiman, D. Gruenert, Q. al-Awqati, Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis, *Nature.* 352 (1991) 70–73. doi:10.1038/352070a0.
- [143] L. Imundo, J. Barasch, A. Prince, Q. Al-Awqati, Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 3019–3023.
- [144] P.M. Haggie, A.S. Verkman, Defective organellar acidification as a cause of cystic fibrosis lung disease: reexamination of a recurring hypothesis, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 296 (2009) L859–867. doi:10.1152/ajplung.00018.2009.
- [145] D. Gill, J.E. Larson, Function of CFTR Protein: Developmental Role, *Bush Al Eds Cyst. Fibros. 21st CenturyBasel Karger.* 34 (2006) 54–60.
- [146] E.F. Tizzano, D. Chitayat, M. Buchwald, Cell-specific localization of CFTR mRNA shows developmentally regulated expression in human fetal tissues, *Hum. Mol. Genet.* 2 (1993) 219–224.
- [147] A.E. Trezise, J.A. Chambers, C.J. Wardle, S. Gould, A. Harris, Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues, *Hum. Mol. Genet.* 2 (1993) 213–218.
- [148] F.R. Long, R.S. Williams, R.G. Castile, Structural airway abnormalities in infants and young children with cystic fibrosis, *J. Pediatr.* 144 (2004) 154–161. doi:10.1016/j.jpeds.2003.09.026.

Références Bibliographiques

- [149] R. Tirouvanziam, S. de Bentzmann, C. Hubeau, J. Hinnrasky, J. Jacquot, B. Péault, et al., Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23 (2000) 121–127. doi:10.1165/ajrcmb.23.2.4214.
- [150] G. Döring, Mechanisms of airway inflammation in cystic fibrosis, *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 7 (1996) 63–66.
- [151] P. Marcorelles, T. Montier, D. Gillet, N. Lagarde, C. Ferec, Evolution of CFTR protein distribution in lung tissue from normal and CF human fetuses, *Pediatr. Pulmonol.* 42 (2007) 1032–1040. doi:10.1002/ppul.20690.
- [152] I. Pin, D. Grenet, P. Scheid, P. Domblides, M. Stern, D. Hubert, [Specific aspects and care of lung involvement in adults with cystic fibrosis], *Rev. Mal. Respir.* 17 (2000) 758–778.
- [153] F. Ratjen, G. Döring, Cystic fibrosis, *Lancet Lond. Engl.* 361 (2003) 681–689. doi:10.1016/S0140-6736(03)12567-6.
- [154] <https://muconature.wordpress.com/>, (n.d.).
- [155] P.B. Davis, M. Drumm, M.W. Konstan, Cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154 (1996) 1229–1256. doi:10.1164/ajrccm.154.5.8912731.
- [156] S. Handwerger, J. Roth, P. Gorden, P. Di Sant' Agnese, D.F. Carpenter, G. Peter, Glucose intolerance in cystic fibrosis, *N. Engl. J. Med.* 281 (1969) 451–461. doi:10.1056/NEJM196908282810901.
- [157] B.M. Lippe, M.A. Sperling, R.R. Dooley, Pancreatic alpha and beta cell functions in cystic fibrosis, *J. Pediatr.* 90 (1977) 751–755.
- [158] A.B. Atlas, S.R. Orenstein, D.M. Orenstein, Pancreatitis in young children with cystic fibrosis, *J. Pediatr.* 120 (1992) 756–759.
- [159] E.A. Oppenheimer, A.L. Case, J.R. Esterly, R.M. Rothberg, Cervical mucus in cystic fibrosis: a possible cause of infertility, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 108 (1970) 673–674.
- [160] J. Brouard, G. Travert, J.F. Duhamel, [Cystic fibrosis], *Rev. Prat.* 49 (1999) 183–190.
- [161] A. Tamalet, B. Fauroux, A. Clement, [Diagnosis and management of cystic fibrosis in children], *Rev. Mal. Respir.* 17 (2000) 725–732.
- [162] C. Férec, C. Verlingue, P. Parent, J.F. Morin, J.P. Codet, G. Rault, et al., Neonatal screening for cystic fibrosis: result of a pilot study using both immunoreactive trypsinogen and cystic fibrosis gene mutation analyses, *Hum. Genet.* 96 (1995) 542–548.
- [163] V. Scotet, M. de Braekeleer, M. Roussey, G. Rault, P. Parent, M. Dagherne, et al., Neonatal screening for cystic fibrosis in Brittany, France: assessment of 10 years' experience and impact on prenatal diagnosis, *Lancet Lond. Engl.* 356 (2000) 789–794. doi:10.1016/S0140-6736(00)02652-0.
- [164] J.J. Pitt, Newborn screening, *Clin. Biochem. Rev. Aust. Assoc. Clin. Biochem.* 31 (2010) 57–68.
- [165] <https://tools.cff.org/research/DrugDevelopmentPipeline/>, (n.d.).
- [166] E. Kerem, Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy, *Pediatr. Pulmonol.* 40 (2005) 183–196. doi:10.1002/ppul.20200.
- [167] J.L. Kreindler, Cystic fibrosis: exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies, *Pharmacol. Ther.* 125 (2010) 219–229. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.10.006.
- [168] U. Griesenbach, E.W.F.W. Alton, Recent advances in understanding and managing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction, *F1000prime Rep.* 7 (2015) 64. doi:10.12703/P7-64.
- [169] E. Kerem, M.W. Konstan, K. De Boeck, F.J. Accurso, I. Sermet-Gaudelus, M. Wilschanski, et al., Cystic Fibrosis Ataluren Study Group, Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial, *Lancet Respir. Med.* 2 (2014) 539–547. doi:10.1016/S2213-2600(14)70100-6.
- [170] R.S. Finkel, Read-through strategies for suppression of nonsense mutations in Duchenne/Becker muscular dystrophy: aminoglycosides and ataluren (PTC124), *J. Child Neurol.* 25 (2010) 1158–1164. doi:10.1177/0883073810371129.
- [171] J. Karijolich, Y.-T. Yu, Therapeutic suppression of premature termination codons: Mechanisms and clinical considerations (Review), *Int. J. Mol. Med.* (2014). doi:10.3892/ijmm.2014.1809.

Références Bibliographiques

- [172] K. Bushby, R. Finkel, B. Wong, R. Barohn, C. Campbell, G.P. Comi, et al., FOR THE PTC124-GD-007-DMD STUDY GROUP, Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy: Ataluren for Dystrophinopathy, *Muscle Nerve*. 50 (2014) 477–487. doi:10.1002/mus.24332.
- [173] I. Pibiri, L. Lentini, R. Melfi, G. Gallucci, A. Pace, A. Spinello, et al., Enhancement of premature stop codon readthrough in the CFTR gene by Ataluren (PTC124) derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 101 (2015) 236–244. doi:10.1016/j.ejmech.2015.06.038.
- [174] H.Y. Ren, D.E. Grove, O. De La Rosa, S.A. Houck, P. Sopha, F. Van Goor, et al., VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1, *Mol. Biol. Cell*. 24 (2013) 3016–3024. doi:10.1091/mbc.E13-05-0240.
- [175] J.P. Clancy, S.M. Rowe, F.J. Accurso, M.L. Aitken, R.S. Amin, M.A. Ashlock, et al., Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation, *Thorax*. 67 (2012) 12–18. doi:10.1136/thoraxjnl-2011-200393.
- [176] R.S. Pettit, C. Fellner, CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis, *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* 39 (2014) 500–511.
- [177] F.J. Accurso, S.M. Rowe, J.P. Clancy, M.P. Boyle, J.M. Dunitz, P.R. Durie, et al., Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation, *N. Engl. J. Med.* 363 (2010) 1991–2003. doi:10.1056/NEJMoa0909825.
- [178] B.W. Ramsey, J. Davies, N.G. McElvaney, E. Tullis, S.C. Bell, P. Dřevínek, et al., VX08-770-102 Study Group, A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation, *N. Engl. J. Med.* 365 (2011) 1663–1672. doi:10.1056/NEJMoa1105185.
- [179] K.-Y. Jih, T.-C. Hwang, Vx-770 potentiates CFTR function by promoting decoupling between the gating cycle and ATP hydrolysis cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 4404–4409. doi:10.1073/pnas.1215982110.
- [180] H. Yu, B. Burton, C.-J. Huang, J. Worley, D. Cao, J.P. Johnson, et al., Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations, *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 11 (2012) 237–245. doi:10.1016/j.jcf.2011.12.005.
- [181] J. Kaiser, Personalized medicine. New cystic fibrosis drug offers hope, at a price, *Science*. 335 (2012) 645. doi:10.1126/science.335.6069.645.
- [182] K. De Boeck, A. Munck, S. Walker, A. Faro, P. Hiatt, G. Gilmartin, et al., Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation, *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 13 (2014) 674–680. doi:10.1016/j.jcf.2014.09.005.
- [183] P.A. Flume, T.G. Liou, D.S. Borowitz, H. Li, K. Yen, C.L. Ordoñez, et al., VX 08-770-104 Study Group, Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation, *Chest*. 142 (2012) 718–724. doi:10.1378/chest.11-2672.
- [184] M.A. Lane, S.J. Doe, A new era in the treatment of cystic fibrosis, *Clin. Med. Lond. Engl.* 14 (2014) 76–78. doi:10.7861/clinmedicine.14-1-76.
- [185] ClinicalTrials.gov: A service of the US National Institutes of Health. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01060566>, (n.d.).
- [186] M.P. Boyle, S.C. Bell, M.W. Konstan, S.A. McColley, S.M. Rowe, E. Rietschel, et al., VX09-809-102 study group, A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial, *Lancet Respir. Med.* 2 (2014) 527–538. doi:10.1016/S2213-2600(14)70132-8.
- [187] C.E. Wainwright, J.S. Elborn, B.W. Ramsey, G. Marigowda, X. Huang, M. Cipolli, et al., TRAFFIC Study Group, TRANSPORT Study Group, Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR, *N. Engl. J. Med.* 373 (2015) 220–231. doi:10.1056/NEJMoa1409547.

Références Bibliographiques

- [188] S.C. Bell, K. De Boeck, M.D. Amaral, New pharmacological approaches for cystic fibrosis: promises, progress, pitfalls, *Pharmacol. Ther.* 145 (2015) 19–34. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.06.005.
- [189] S. Donaldson, J. Pilewski, M. Griese, VX-661, an investigational CFTR corrector, in combination with ivacaftor, a CFTR potentiator, in patients with CF homozygous for the F508del-CFTR mutation, interim analysis., *Present. Eur. Cyst. Fibros. Conf.* (2013).
- [190] <https://tools.cff.org/research/DrugDevelopmentPipeline/>, (n.d.).
- [191] W.J. Welch, C.R. Brown, Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding, *Cell Stress Chaperones.* 1 (1996) 109–115.
- [192] R.C. Rubenstein, M.E. Egan, P.L. Zeitlin, In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 2457–2465. doi:10.1172/JCI119788.
- [193] R.C. Rubenstein, P.L. Zeitlin, Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278 (2000) C259–267.
- [194] S. Alberti, K. Böhse, V. Arndt, A. Schmitz, J. Höhfeld, The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *Mol. Biol. Cell.* 15 (2004) 4003–4010. doi:10.1091/mbc.E04-04-0293.
- [195] R.C. Rubenstein, P.L. Zeitlin, A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157 (1998) 484–490. doi:10.1164/ajrccm.157.2.9706088.
- [196] P.L. Zeitlin, M. Diener-West, R.C. Rubenstein, M.P. Boyle, C.K.K. Lee, L. Brass-Ernst, Evidence of CFTR function in cystic fibrosis after systemic administration of 4-phenylbutyrate, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 6 (2002) 119–126. doi:10.1006/mthe.2002.0639.
- [197] M. Lim, K. McKenzie, A.D. Floyd, E. Kwon, P.L. Zeitlin, Modulation of deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator trafficking and function with 4-phenylbutyrate and flavonoids, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31 (2004) 351–357. doi:10.1165/rcmb.2002-0086OC.
- [198] C.G. Fraga, M. Galleano, S.V. Verstraeten, P.I. Oteiza, Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols, *Mol. Aspects Med.* 31 (2010) 435–445. doi:10.1016/j.mam.2010.09.006.
- [199] F. Van Goor, K.S. Straley, D. Cao, J. González, S. Hadida, A. Hazlewood, et al., Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 290 (2006) L1117–1130. doi:10.1152/ajplung.00169.2005.
- [200] P. Kim Chiaw, L. Wellhauser, L.J. Huan, M. Ramjeesingh, C.E. Bear, A chemical corrector modifies the channel function of F508del-CFTR, *Mol. Pharmacol.* 78 (2010) 411–418. doi:10.1124/mol.110.065862.
- [201] Y. Wang, M.C. Bartlett, T.W. Loo, D.M. Clarke, Specific rescue of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing mutants using pharmacological chaperones, *Mol. Pharmacol.* 70 (2006) 297–302. doi:10.1124/mol.106.023994.
- [202] Y. Wang, T.W. Loo, M.C. Bartlett, D.M. Clarke, Correctors promote maturation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-processing mutants by binding to the protein, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 33247–33251. doi:10.1074/jbc.C700175200.
- [203] L. Wellhauser, P. Kim Chiaw, S. Pasyk, C. Li, M. Ramjeesingh, C.E. Bear, A small-molecule modulator interacts directly with deltaPhe508-CFTR to modify its ATPase activity and conformational stability, *Mol. Pharmacol.* 75 (2009) 1430–1438. doi:10.1124/mol.109.055608.
- [204] S. Pasyk, C. Li, M. Ramjeesingh, C.E. Bear, Direct interaction of a small-molecule modulator with G551D-CFTR, a cystic fibrosis-causing mutation associated with severe disease, *Biochem. J.* 418 (2009) 185–190. doi:10.1042/BJ20081424.
- [205] L.C. Pyle, A. Ehrhardt, L.H. Mitchell, L. Fan, A. Ren, A.P. Naren, et al., Regulatory domain phosphorylation to distinguish the mechanistic basis underlying acute CFTR modulators, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 301 (2011) L587–597. doi:10.1152/ajplung.00465.2010.

Références Bibliographiques

- [206] M. Robinson, E. Daviskas, S. Eberl, J. Baker, H.K. Chan, S.D. Anderson, et al., The effect of inhaled mannitol on bronchial mucus clearance in cystic fibrosis patients: a pilot study, *Eur. Respir. J.* 14 (1999) 678–685.
- [207] E. Daviskas, B.K. Rubin, Effect of inhaled dry powder mannitol on mucus and its clearance, *Expert Rev. Respir. Med.* 7 (2013) 65–75. doi:10.1586/ers.12.72.
- [208] H.A.W.M. Tiddens, S.H. Donaldson, M. Rosenfeld, P.D. Paré, Cystic fibrosis lung disease starts in the small airways: can we treat it more effectively?, *Pediatr. Pulmonol.* 45 (2010) 107–117. doi:10.1002/ppul.21154.
- [209] R.C. Boucher, Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease, *J. Intern. Med.* 261 (2007) 5–16. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01744.x.
- [210] E. Daviskas, S.D. Anderson, S. Eberl, H.K. Chan, G. Bautovich, Inhalation of dry powder mannitol improves clearance of mucus in patients with bronchiectasis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159 (1999) 1843–1848. doi:10.1164/ajrccm.159.6.9809074.
- [211] A. Teper, A. Jaques, B. Charlton, Inhaled mannitol in patients with cystic fibrosis: A randomised open-label dose response trial, *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 10 (2011) 1–8. doi:10.1016/j.jcf.2010.08.020.
- [212] D. Bilton, P. Robinson, P. Cooper, C.G. Gallagher, J. Kolbe, H. Fox, et al., CF301 Study Investigators, Inhaled dry powder mannitol in cystic fibrosis: an efficacy and safety study, *Eur. Respir. J.* 38 (2011) 1071–1080. doi:10.1183/09031936.00187510.
- [213] M.L. Aitken, G. Bellon, K. De Boeck, P.A. Flume, H.G. Fox, D.E. Geller, et al., CF302 Investigators, Long-term inhaled dry powder mannitol in cystic fibrosis: an international randomized study, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185 (2012) 645–652. doi:10.1164/rccm.201109-1666OC.
- [214] ClinicalTrials.gov: A service of the US National Institutes of Health. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01883531>, (n.d.). <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01883531>.
- [215] M.D. Amaral, K. Kunzelmann, Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis, *Trends Pharmacol. Sci.* 28 (2007) 334–341. doi:10.1016/j.tips.2007.05.004.
- [216] M. Althaus, ENaC inhibitors and airway re-hydration in cystic fibrosis: state of the art, *Curr. Mol. Pharmacol.* 6 (2013) 3–12.
- [217] A.J. Hirsh, J.R. Sabater, A. Zamurs, R.T. Smith, A.M. Paradiso, S. Hopkins, et al., Evaluation of second generation amiloride analogs as therapy for cystic fibrosis lung disease, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311 (2004) 929–938. doi:10.1124/jpet.104.071886.
- [218] A.M. Jones, J.M. Helm, Emerging treatments in cystic fibrosis, *Drugs.* 69 (2009) 1903–1910. doi:10.2165/11318500-000000000-00000.
- [219] A. Hirsh, J. St George, W. Thelin, RGS- 9411: a potential aerosol pharmacotherapy for CF., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179 (2009) A1195.
- [220] <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00800579>, (n.d.).
- [221] ClinicalTrials.gov: A service of the US National Institutes of Health. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01025713>, (n.d.).
- [222] T. Hunt, H.C. Atherton-Watson, J. Axford, S.P. Collingwood, K.J. Coote, B. Cox, et al., Discovery of a novel chemotype of potent human ENaC blockers using a bioisostere approach. Part 1: quaternary amines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 929–932. doi:10.1016/j.bmcl.2011.12.016.
- [223] K. Coote, H.C. Atherton-Watson, R. Sugar, A. Young, A. MacKenzie-Beevor, M. Gosling, et al., Camostat attenuates airway epithelial sodium channel function in vivo through the inhibition of a channel-activating protease, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329 (2009) 764–774. doi:10.1124/jpet.108.148155.
- [224] ClinicalTrials.gov: A service of the US National Institutes of Health. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00506792>, (n.d.).

Références Bibliographiques

- [225] S.M. Rowe, G. Reeves, H. Hathorne, G.M. Solomon, S. Abbi, D. Renard, et al., Reduced sodium transport with nasal administration of the prostaticin inhibitor camostat in subjects with cystic fibrosis, *Chest*. 144 (2013) 200–207. doi:10.1378/chest.12-2431.
- [226] V. Vallon, T. Rieg, Regulation of renal NaCl and water transport by the ATP/UTP/P2Y2 receptor system, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 301 (2011) F463–475. doi:10.1152/ajprenal.00236.2011.
- [227] W. Namkung, Z. Yao, W.E. Finkbeiner, A.S. Verkman, Small-molecule activators of TMEM16A, a calcium-activated chloride channel, stimulate epithelial chloride secretion and intestinal contraction, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25 (2011) 4048–4062. doi:10.1096/fj.11-191627.
- [228] E.R. Lazarowski, R.C. Boucher, Purinergic receptors in airway epithelia, *Curr. Opin. Pharmacol.* 9 (2009) 262–267. doi:10.1016/j.coph.2009.02.004.
- [229] B.R. Yerxa, J.R. Sabater, C.W. Davis, M.J. Stutts, M. Lang-Furr, M. Picher, et al., Pharmacology of INS37217 [P(1)-(uridine 5')-P(4)-(2'-deoxycytidine 5')tetrphosphate, tetrasodium salt], a next-generation P2Y(2) receptor agonist for the treatment of cystic fibrosis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302 (2002) 871–880. doi:10.1124/jpet.102.035485.
- [230] M.J. Stutts, T. Navratil, S.F. Okada, R.C. Boucher, Denufosol Stimulates Chloride Transport, Inhibits Sodium Absorption And Restores Airway Surface Liquid Layer In Primary Airway Epithelial Cells From CF Patients, in: American Thoracic Society, 2011: pp. A6123–A6123. doi:10.1164/ajrccm-conference.2011.183.1_MeetingAbstracts.A6123.
- [231] ClinicalTrials.gov. A service of the US National Institutes of Health. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00357279>., (n.d.).
- [232] F.J. Accurso, R.B. Moss, R.W. Wilmott, R.D. Anbar, A.E. Schaberg, T.A. Durham, et al., TIGER-1 Investigator Study Group, Denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis and normal to mildly impaired lung function, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183 (2011) 627–634. doi:10.1164/rccm.201008-1267OC.
- [233] F. Ratjen, T. Durham, T. Navratil, A. Schaberg, F.J. Accurso, C. Wainwright, et al., TIGER-2 Study Investigator Group, Long term effects of denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis, *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 11 (2012) 539–549. doi:10.1016/j.jcf.2012.05.003.
- [234] M. Althaus, W.G. Clauss, M. Fronius, Amiloride-sensitive sodium channels and pulmonary edema, *Pulm. Med.* 2011 (2011) 830320. doi:10.1155/2011/830320.
- [235] J.E. Melvin, D. Yule, T. Shuttleworth, T. Begenisich, Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells, *Annu. Rev. Physiol.* 67 (2005) 445–469. doi:10.1146/annurev.physiol.67.041703.084745.
- [236] H. Grasemann, F. Stehling, H. Brunar, R. Widmann, T.W. Laliberte, L. Molina, et al., Inhalation of Moli1901 in patients with cystic fibrosis, *Chest*. 131 (2007) 1461–1466. doi:10.1378/chest.06-2085.
- [237] ClinicalTrials.gov: A service of the US National Institutes of Health. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00671736>., (n.d.).
- [238] <http://www.vaincrelamuco.org/2015/09/25/le-comite-des-medicaments-usage-humain-chmp-emet-trois-avis-positifs-sur-orkambitm-et>, (n.d.).
- [239] E.R. Weibel, *Morphometry of the human lung.*, Springer Verlag and Academic Press, Berlin, New York. (1963).
- [240] <http://www.hwcr.org/Health/Disease/Photos/Pulmonary%20circulation.jpg>, (n.d.).
- [241] <http://www.myvmc.com/anatomy/respiratory-system/>, (n.d.).
- [242] C. Coraux, R. Hajj, P. Lesimple, E. Puchelle, Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire, *m/s MEDECINE SCIENCES.* 21 (2005) 1063–1069.
- [243] R. Bals, D.J. Weiner, J.M. Wilson, The innate immune system in cystic fibrosis lung disease, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 303–307. doi:10.1172/JCI6277.
- [244] E. Puchelle, S. de Bentzmann, J. Zahm, Defense properties of airway surface liquid. In : Gibson GJ, Geddes DM, Costabel U, Sterk P, Corrin B, eds. *Respiratory medicine*. London : Saunders, *Respiratory medicine*. (2003) 194–204.

Références Bibliographiques

- [245] S.D. Reynolds, A.M. Malkinson, Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (2010) 1–4. doi:10.1016/j.biocel.2009.09.002.
- [246] L.M. Crosby, C.M. Waters, Epithelial repair mechanisms in the lung, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 298 (2010) L715–731. doi:10.1152/ajplung.00361.2009.
- [247] C.M. Evans, J.S. Koo, Airway mucus: the good, the bad, the sticky, *Pharmacol. Ther.* 121 (2009) 332–348. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.11.001.
- [248] K.C. Stone, R.R. Mercer, P. Gehr, B. Stockstill, J.D. Crapo, Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6 (1992) 235–243. doi:10.1165/ajrcmb/6.2.235.
- [249] Z.S. Azzam, J.I. Sznajder, Lung Edema Clearance: Relevance to Patients with Lung Injury, *Rambam Maimonides Med. J.* 6 (2015). doi:10.5041/RMMJ.10210.
- [250] L.G. Dobbs, M.D. Johnson, J. Vanderbilt, L. Allen, R. Gonzalez, The great big alveolar TI cell: evolving concepts and paradigms, *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 25 (2010) 55–62. doi:10.1159/000272063.
- [251] R. Gonzalez, Y.H. Yang, C. Griffin, L. Allen, Z. Tigue, L. Dobbs, Freshly isolated rat alveolar type I cells, type II cells, and cultured type II cells have distinct molecular phenotypes, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 288 (2005) L179–189. doi:10.1152/ajplung.00272.2004.
- [252] J. Chen, Z. Chen, N.R. Chintagari, M. Bhaskaran, N. Jin, T. Narasaraju, et al., Alveolar type I cells protect rat lung epithelium from oxidative injury, *J. Physiol.* 572 (2006) 625–638. doi:10.1113/jphysiol.2005.103465.
- [253] R.H. Notter, P.R. Chess, Z. Wang, SURFACTANT / Overview Surfactant Protein A (SP-A) Surfactant Proteins B and C (SP-B and SP-C) Surfactant Protein D (SP-D), Univ. Rochester Med. Cent. Rochester NY USA Elsevier Ltd Rights Reserv. (2006) 135–143.
- [254] M.D. Johnson, Ion transport in alveolar type I cells, *Mol. Biosyst.* 3 (2007) 178–186. doi:10.1039/b614348b.
- [255] S. Matalon, D.J. Benos, R.M. Jackson, Biophysical and molecular properties of amiloride-inhibitable Na⁺ channels in alveolar epithelial cells, *Am. J. Physiol.* 271 (1996) L1–22.
- [256] G.M. Mutlu, J.I. Sznajder, Mechanisms of pulmonary edema clearance, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 289 (2005) L685–695. doi:10.1152/ajplung.00247.2005.
- [257] N. Farman, C.R. Talbot, R. Boucher, M. Fay, C. Canessa, B. Rossier, et al., Noncoordinated expression of alpha-, beta-, and gamma-subunit mRNAs of epithelial Na⁺ channel along rat respiratory tract, *Am. J. Physiol.* 272 (1997) C131–141.
- [258] G. Yue, W.J. Russell, D.J. Benos, R.M. Jackson, M.A. Olman, S. Matalon, Increased expression and activity of sodium channels in alveolar type II cells of hyperoxic rats, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 8418–8422.
- [259] C.L. Talbot, D.G. Bosworth, E.L. Briley, D.A. Fenstermacher, R.C. Boucher, S.E. Gabriel, et al., Quantitation and localization of ENaC subunit expression in fetal, newborn, and adult mouse lung, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20 (1999) 398–406. doi:10.1165/ajrcmb.20.3.3283.
- [260] Z.S. Azzam, J.I. Sznajder, The cellular mechanisms contributing to lung edema clearance, *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ.* 2 (2000) 235–239.
- [261] E.E. Schneeberger, K.M. McCarthy, Cytochemical localization of Na⁺-K⁺-ATPase in rat type II pneumocytes, *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985. 60 (1986) 1584–1589.
- [262] K.M. Ridge, W.G. Olivera, F. Saldias, Z. Azzam, S. Horowitz, D.H. Rutschman, et al., Alveolar type 1 cells express the alpha2 Na,K-ATPase, which contributes to lung liquid clearance, *Circ. Res.* 92 (2003) 453–460. doi:10.1161/01.RES.0000059414.10360.F2.
- [263] V. Castranova, J. Rabovsky, J.H. Tucker, P.R. Miles, The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 93 (1988) 472–483.
- [264] E. Brochiero, A. Dagenais, A. Privé, Y. Berthiaume, R. Grygorczyk, Evidence of a functional CFTR Cl⁻ channel in adult alveolar epithelial cells, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287 (2004) L382–392. doi:10.1152/ajplung.00320.2002.
- [265] https://en.wikipedia.org/wiki/File:Respiratory_Tract_Histological_Differences.png, (n.d.).

Références Bibliographiques

- [266] <http://www.mc.vanderbilt.edu/histology/labmanual2002/labsection2/Respiratory03.htm>, (n.d.).
- [267] C.S. Chu, B.C. Trapnell, S. Curristin, G.R. Cutting, R.G. Crystal, Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA, *Nat. Genet.* 3 (1993) 151–156. doi:10.1038/ng0293-151.
- [268] I.A. Pringle, S.C. Hyde, D.R. Gill, Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: recent developments and future prospects, *Expert Opin. Biol. Ther.* 9 (2009) 991–1003. doi:10.1517/14712590903055029.
- [269] W.R. Otto, Lung epithelial stem cells, *J. Pathol.* 197 (2002) 527–535. doi:10.1002/path.1160.
- [270] A.-K.T. Perl, D. Riethmacher, J.A. Whitsett, Conditional depletion of airway progenitor cells induces peribronchiolar fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183 (2011) 511–521. doi:10.1164/rccm.201005-0744OC.
- [271] M. Ortega-Martínez, L.E. Rodríguez-Flores, C. de-la-Garza-González, J. Ancer-Rodríguez, G. Jaramillo-Rangel, Detection of a novel stem cell probably involved in normal turnover of the lung airway epithelium, *J. Cell. Mol. Med.* (2015). doi:10.1111/jcmm.12653.
- [272] J.R. Dorin, R. Farley, S. Webb, S.N. Smith, E. Farini, S.J. Delaney, et al., A demonstration using mouse models that successful gene therapy for cystic fibrosis requires only partial gene correction, *Gene Ther.* 3 (1996) 797–801.
- [273] L.G. Johnson, J.C. Olsen, B. Sarkadi, K.L. Moore, R. Swanstrom, R.C. Boucher, Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis, *Nat. Genet.* 2 (1992) 21–25. doi:10.1038/ng0992-21.
- [274] S.L. Farnen, P.H. Karp, P. Ng, D.J. Palmer, D.R. Koehler, J. Hu, et al., Gene transfer of CFTR to airway epithelia: low levels of expression are sufficient to correct Cl⁻ transport and overexpression can generate basolateral CFTR, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 289 (2005) L1123–L1130. doi:10.1152/ajplung.00049.2005.
- [275] X. Sun, Z. Yan, Y. Yi, Z. Li, D. Lei, C.S. Rogers, et al., Adeno-associated virus-targeted disruption of the CFTR gene in cloned ferrets, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 1578–1583. doi:10.1172/JCI34599.
- [276] C.S. Rogers, Y. Hao, T. Rokhlina, M. Samuel, D.A. Stoltz, Y. Li, et al., Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 1571–1577. doi:10.1172/JCI34773.
- [277] Z. Yan, Z.A. Stewart, P.L. Sinn, J.C. Olsen, J. Hu, P.B. McCray, et al., Ferret and pig models of cystic fibrosis: prospects and promise for gene therapy, *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 26 (2015) 38–49. doi:10.1089/humc.2014.154.
- [278] X. Wang, Y. Zhang, A. Amberson, J.F. Engelhardt, New models of the tracheal airway define the glandular contribution to airway surface fluid and electrolyte composition, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24 (2001) 195–202. doi:10.1165/ajrcmb.24.2.3918.
- [279] C.S. Rogers, W.M. Abraham, K.A. Brogden, J.F. Engelhardt, J.T. Fisher, P.B. McCray, et al., The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 295 (2008) L240–L263. doi:10.1152/ajplung.90203.2008.
- [280] J.H. Widdicombe, Transgenic animals may help resolve a sticky situation in cystic fibrosis, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 3093–3096. doi:10.1172/JCI44235.
- [281] X. Liu, R.R. Driskell, J.F. Engelhardt, Airway glandular development and stem cells, *Curr. Top. Dev. Biol.* 64 (2004) 33–56. doi:10.1016/S0070-2153(04)64003-8.
- [282] X. Liu, M. Luo, L. Zhang, W. Ding, Z. Yan, J.F. Engelhardt, Bioelectric properties of chloride channels in human, pig, ferret, and mouse airway epithelia, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 36 (2007) 313–323. doi:10.1165/rcmb.2006-0286OC.
- [283] L.S. Ostedgaard, D.K. Meyerholz, J.-H. Chen, A.A. Pezzulo, P.H. Karp, T. Rokhlina, et al., The ΔF508 mutation causes CFTR misprocessing and cystic fibrosis-like disease in pigs, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 74ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3001868.

Références Bibliographiques

- [284] A.H. Handyside, J.G. Lesko, J.J. Tarin, R.M. Winston, M.R. Hughes, Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis, *N. Engl. J. Med.* 327 (1992) 905–909. doi:10.1056/NEJM199209243271301.
- [285] J.E. Larson, S.L. Morrow, L. Happel, J.F. Sharp, J.C. Cohen, Reversal of cystic fibrosis phenotype in mice by gene therapy in utero, *Lancet Lond. Engl.* 349 (1997) 619–620. doi:10.1016/S0140-6736(05)61567-X.
- [286] L.A. Davies, A. Varathalingam, H. Painter, A.E. Lawton, S.G. Sumner-Jones, G.A. Nunez-Alonso, et al., Adenovirus-mediated in utero expression of CFTR does not improve survival of CFTR knockout mice, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16 (2008) 812–818. doi:10.1038/mt.2008.25.
- [287] S.M.K. Buckley, S.N. Waddington, S. Jezzard, A. Bergau, M. Themis, L.J. MacVinish, et al., Intra-amniotic delivery of CFTR-expressing adenovirus does not reverse cystic fibrosis phenotype in inbred CFTR-knockout mice, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16 (2008) 819–824. doi:10.1038/mt.2008.26.
- [288] M. Conese, F. Ascenzioni, A.C. Boyd, C. Coutelle, I. De Fino, S. De Smedt, et al., Gene and cell therapy for cystic fibrosis: From bench to bedside, *J. Cyst. Fibros.* 10 (2011) S114–S128. doi:10.1016/S1569-1993(11)60017-9.
- [289] S.G. Keswani, S. Balaji, L. Le, A. Leung, A.B. Katz, F.-Y. Lim, et al., Pseudotyped AAV vector-mediated gene transfer in a human fetal trachea xenograft model: implications for in utero gene therapy for cystic fibrosis, *PLoS One.* 7 (2012) e43633. doi:10.1371/journal.pone.0043633.
- [290] K. Nishida, Z. Smith, D. Rana, J. Palmer, G.I. Gallicano, Cystic fibrosis: a look into the future of prenatal screening and therapy, *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 105 (2015) 73–80. doi:10.1002/bdrc.21091.
- [291] A.P. Wong, A.E. Dutly, A. Sacher, H. Lee, D.M. Hwang, M. Liu, et al., Targeted cell replacement with bone marrow cells for airway epithelial regeneration, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293 (2007) L740–752. doi:10.1152/ajplung.00050.2007.
- [292] N. Gupta, X. Su, B. Popov, J.W. Lee, V. Serikov, M.A. Matthay, Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 179 (2007) 1855–1863.
- [293] D. Piro, J. Rejman, M. Conese, Stem cell therapy for cystic fibrosis: current status and future prospects, *Expert Rev. Respir. Med.* 2 (2008) 365–380. doi:10.1586/17476348.2.3.365.
- [294] J. Rejman, C. Colombo, M. Conese, Engraftment of bone marrow-derived stem cells to the lung in a model of acute respiratory infection by *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17 (2009) 1257–1265. doi:10.1038/mt.2009.96.
- [295] A.-L. Leblond, P. Naud, V. Forest, C. Gourden, C. Sagan, B. Romefort, et al., Developing cell therapy techniques for respiratory disease: intratracheal delivery of genetically engineered stem cells in a murine model of airway injury, *Hum. Gene Ther.* 20 (2009) 1329–1343. doi:10.1089/hum.2009.035.
- [296] D. Boruczkowski, D. Gładysz, U. Demkow, K. Pawelec, The Potential of Wharton’s Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells in Treating Patients with Cystic Fibrosis, *Adv. Exp. Med. Biol.* 833 (2015) 23–29. doi:10.1007/5584_2014_17.
- [297] <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>, (n.d.).
- [298] T. Goto, T. Nishi, O. Kobayashi, T. Tamura, S.B. Dev, H. Takeshima, et al., Combination electro-gene therapy using herpes virus thymidine kinase and interleukin-12 expression plasmids is highly efficient against murine carcinomas in vivo, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 10 (2004) 929–937. doi:10.1016/j.ymthe.2004.07.028.
- [299] P. Tiberghien, C. Ferrand, B. Lioure, N. Milpied, R. Angonin, E. Deconinck, et al., Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft, *Blood.* 97 (2001) 63–72.
- [300] E. Litvinova, S. Maury, O. Boyer, S. Bruel, L. Benard, G. Boisserie, et al., Graft-versus-leukemia effect after suicide-gene-mediated control of graft-versus-host disease, *Blood.* 100 (2002) 2020–2025. doi:10.1182/blood-2002-01-0161.

Références Bibliographiques

- [301] L. Gorman, D. Suter, V. Emerick, D. Schümperli, R. Kole, Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 4929–4934.
- [302] R. Pelletier, S.O.P. Caron, J. Puymirat, RNA based gene therapy for dominantly inherited diseases, *Curr. Gene Ther.* 6 (2006) 131–146.
- [303] J.C. van Deutekom, M. Bremmer-Bout, A.A. Janson, I.B. Ginjaar, F. Baas, J.T. den Dunnen, et al., Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 1547–1554.
- [304] J.C. van Deutekom, A.A. Janson, I.B. Ginjaar, W.S. Frankhuizen, A. Aartsma-Rus, M. Bremmer-Bout, et al., Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051, *N. Engl. J. Med.* 357 (2007) 2677–2686. doi:10.1056/NEJMoa073108.
- [305] B.T. Kren, C.J. Steer, The application of DNA repair vectors to gene therapy, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 473–481.
- [306] X. Liu, Q. Jiang, S.G. Mansfield, M. Puttaraju, Y. Zhang, W. Zhou, et al., Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing, *Nat. Biotechnol.* 20 (2002) 47–52. doi:10.1038/nbt0102-47.
- [307] X. Liu, M. Luo, L.N. Zhang, Z. Yan, R. Zak, W. Ding, et al., Spliceosome-mediated RNA trans-splicing with recombinant adeno-associated virus partially restores cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function to polarized human cystic fibrosis airway epithelial cells, *Hum. Gene Ther.* 16 (2005) 1116–1123. doi:10.1089/hum.2005.16.1116.
- [308] S.G. Mansfield, J. Kole, M. Puttaraju, C.C. Yang, M.A. Garcia-Blanco, J.A. Cohn, et al., Repair of CFTR mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing, *Gene Ther.* 7 (2000) 1885–1895. doi:10.1038/sj.gt.3301307.
- [309] F.D. Urnov, E.J. Rebar, M.C. Holmes, H.S. Zhang, P.D. Gregory, Genome editing with engineered zinc finger nucleases, *Nat. Rev. Genet.* 11 (2010) 636–646. doi:10.1038/nrg2842.
- [310] J.K. Joung, J.D. Sander, TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (2013) 49–55. doi:10.1038/nrm3486.
- [311] P.D. Hsu, D.A. Scott, J.A. Weinstein, F.A. Ran, S. Konermann, V. Agarwala, et al., DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases, *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) 827–832. doi:10.1038/nbt.2647.
- [312] Y. Wu, D. Liang, Y. Wang, M. Bai, W. Tang, S. Bao, et al., Correction of a Genetic Disease in Mouse via Use of CRISPR-Cas9, *Cell Stem Cell.* 13 (2013) 659–662. doi:10.1016/j.stem.2013.10.016.
- [313] C.M. Lee, R. Flynn, J.A. Hollywood, M.F. Scallan, P.T. Harrison, Correction of the Δ F508 Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Zinc-Finger Nuclease Homology-Directed Repair, *BioResearch Open Access.* 1 (2012) 99–108. doi:10.1089/biores.2012.0218.
- [314] G. Schwank, B.-K. Koo, V. Sasselli, J.F. Dekkers, I. Heo, T. Demircan, et al., Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients, *Cell Stem Cell.* 13 (2013) 653–658. doi:10.1016/j.stem.2013.11.002.
- [315] <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>, (n.d.).
- [316] S.L. Ginn, I.E. Alexander, M.L. Edelstein, M.R. Abedi, J. Wixon, Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update: Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update, *J. Gene Med.* 15 (2013) 65–77. doi:10.1002/jgm.2698.
- [317] R.B. Moss, C. Milla, J. Colombo, F. Accurso, P.L. Zeitlin, J.P. Clancy, et al., Repeated Aerosolized AAV-CFTR for Treatment of Cystic Fibrosis: A Randomized Placebo-Controlled Phase 2B Trial, *Hum. Gene Ther.* 18 (2007) 726–732. doi:10.1089/hum.2007.022.
- [318] M.L. Aitken, R.B. Moss, D.A. Waltz, M.E. Dovey, M.R. Tonelli, S.C. McNamara, et al., A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease, *Hum. Gene Ther.* 12 (2001) 1907–1916. doi:10.1089/104303401753153956.
- [319] T.R. Flotte, Recombinant adeno-associated virus vectors for cystic fibrosis gene therapy, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3 (2001) 497–502.

Références Bibliographiques

- [320] J.A. Wagner, A.H. Messner, M.L. Moran, R. Daifuku, K. Kouyama, J.K. Desch, et al., Safety and biological efficacy of an adeno-associated virus vector-cystic fibrosis transmembrane regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus, *The Laryngoscope*. 109 (1999) 266–274.
- [321] E.W.F.W. Alton, D.K. Armstrong, D. Ashby, K.J. Bayfield, D. Bilton, E.V. Bloomfield, et al., Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial, *Lancet Respir. Med.* (2015). doi:10.1016/S2213-2600(15)00245-3.
- [322] <http://www.cfgenetherapy.org.uk/index.php>, (n.d.).
- [323] U. Griesenbach, M. Inoue, C. Meng, R. Farley, M. Chan, N.K. Newman, et al., Assessment of F/HN-pseudotyped lentivirus as a clinically relevant vector for lung gene therapy, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186 (2012) 846–856. doi:10.1164/rccm.201206-1056OC.
- [324] P. Cmielewski, M. Donnelley, D.W. Parsons, Long-term therapeutic and reporter gene expression in lentiviral vector treated cystic fibrosis mice, *J. Gene Med.* 16 (2014) 291–299. doi:10.1002/jgm.2778.
- [325] <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>, (n.d.).
- [326] R.W. Walters, T. Grunst, J.M. Bergelson, R.W. Finberg, M.J. Welsh, J. Zabner, Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 10219–10226.
- [327] J.P. Katkin, B.E. Gilbert, C. Langston, K. French, A.L. Beaudet, Aerosol delivery of a beta-galactosidase adenoviral vector to the lungs of rodents, *Hum. Gene Ther.* 6 (1995) 985–995. doi:10.1089/hum.1995.6.8-985.
- [328] A. Scaria, J.A. St George, C. Jiang, J.M. Kaplan, S.C. Wadsworth, R.J. Gregory, Adenovirus-mediated persistent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in mouse airway epithelium, *J. Virol.* 72 (1998) 7302–7309.
- [329] J. Zabner, L.A. Couture, R.J. Gregory, S.M. Graham, A.E. Smith, M.J. Welsh, Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis, *Cell*. 75 (1993) 207–216.
- [330] J.G. Hay, N.G. McElvaney, J. Herena, R.G. Crystal, Modification of nasal epithelial potential differences of individuals with cystic fibrosis consequent to local administration of a normal CFTR cDNA adenovirus gene transfer vector, *Hum. Gene Ther.* 6 (1995) 1487–1496. doi:10.1089/hum.1995.6.11-1487.
- [331] B.G. Harvey, P.L. Leopold, N.R. Hackett, T.M. Grasso, P.M. Williams, A.L. Tucker, et al., Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus, *J. Clin. Invest.* 104 (1999) 1245–1255. doi:10.1172/JCI7935.
- [332] P.M. Joseph, B.P. O’Sullivan, A. Lapey, H. Dorkin, J. Oren, R. Balfour, et al., Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. I. Methods, safety, and clinical implications, *Hum. Gene Ther.* 12 (2001) 1369–1382. doi:10.1089/104303401750298535.
- [333] R.J. Pickles, D. McCarty, H. Matsui, P.J. Hart, S.H. Randell, R.C. Boucher, Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer, *J. Virol.* 72 (1998) 6014–6023.
- [334] G. Bellon, L. Michel-Calemard, D. Thouvenot, V. Jagneaux, F. Poitevin, C. Malcus, et al., Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial, *Hum. Gene Ther.* 8 (1997) 15–25. doi:10.1089/hum.1997.8.1-15.
- [335] J. Zabner, B.W. Ramsey, D.P. Meeker, M.L. Aitken, R.P. Balfour, R.L. Gibson, et al., Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 1504–1511. doi:10.1172/JCI118573.
- [336] U. Griesenbach, E.W.F.W. Alton, UK Cystic Fibrosis Gene Therapy Consortium, Gene transfer to the lung: lessons learned from more than 2 decades of CF gene therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 128–139. doi:10.1016/j.addr.2008.09.010.

Références Bibliographiques

- [337] D.K. Armstrong, S. Cunningham, J.C. Davies, E.W.F.W. Alton, Gene therapy in cystic fibrosis, *Arch. Dis. Child.* 99 (2014) 465–468. doi:10.1136/archdischild-2012-302158.
- [338] O. Granio, K.J.D. Ashbourne Excoffon, P. Henning, P. Melin, C. Norez, G. Gonzalez, et al., Adenovirus 5-fiber 35 chimeric vector mediates efficient apical correction of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator defect in cystic fibrosis primary airway epithelia, *Hum. Gene Ther.* 21 (2010) 251–269. doi:10.1089/hum.2009.056.
- [339] U. Griesenbach, E.W.F.W. Alton, Progress in gene and cell therapy for cystic fibrosis lung disease, *Curr. Pharm. Des.* 18 (2012) 642–662.
- [340] R.B. Moss, D. Rodman, L.T. Spencer, M.L. Aitken, P.L. Zeitlin, D. Waltz, et al., Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial, *Chest.* 125 (2004) 509–521.
- [341] T.R. Flotte, P.L. Zeitlin, T.C. Reynolds, A.E. Heald, P. Pedersen, S. Beck, et al., Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study, *Hum. Gene Ther.* 14 (2003) 1079–1088. doi:10.1089/104303403322124792.
- [342] J.A. Wagner, I.B. Nepomuceno, A.H. Messner, M.L. Moran, E.P. Batson, S. Dimiceli, et al., A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies, *Hum. Gene Ther.* 13 (2002) 1349–1359. doi:10.1089/104303402760128577.
- [343] J. Sirninger, C. Muller, S. Braag, Q. Tang, H. Yue, C. Detrisac, et al., Functional characterization of a recombinant adeno-associated virus 5-pseudotyped cystic fibrosis transmembrane conductance regulator vector, *Hum. Gene Ther.* 15 (2004) 832–841. doi:10.1089/hum.2004.15.832.
- [344] I. Virella-Lowell, B. Zusman, K. Foust, S. Loiler, T. Conlon, S. Song, et al., Enhancing rAAV vector expression in the lung, *J. Gene Med.* 7 (2005) 842–850. doi:10.1002/jgm.759.
- [345] W. Shi, J.S. Bartlett, RGD inclusion in VP3 provides adeno-associated virus type 2 (AAV2)-based vectors with a heparan sulfate-independent cell entry mechanism, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 7 (2003) 515–525.
- [346] A.F. White, M. Mazur, E.J. Sorscher, K.R. Zinn, S. Ponnazhagan, Genetic modification of adeno-associated viral vector type 2 capsid enhances gene transfer efficiency in polarized human airway epithelial cells, *Hum. Gene Ther.* 19 (2008) 1407–1414. doi:10.1089/hgt.2008.117.
- [347] D. Duan, Y. Yue, J.F. Engelhardt, Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 4 (2001) 383–391. doi:10.1006/mthe.2001.0456.
- [348] C.L. Halbert, J.M. Allen, A.D. Miller, Efficient mouse airway transduction following recombination between AAV vectors carrying parts of a larger gene, *Nat. Biotechnol.* 20 (2002) 697–701. doi:10.1038/nbt0702-697.
- [349] S.J. Reich, A. Auricchio, M. Hildinger, E. Glover, A.M. Maguire, J.M. Wilson, et al., Efficient trans-splicing in the retina expands the utility of adeno-associated virus as a vector for gene therapy, *Hum. Gene Ther.* 14 (2003) 37–44. doi:10.1089/10430340360464697.
- [350] Z. Yan, Y. Zhang, D. Duan, J.F. Engelhardt, Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 6716–6721.
- [351] H. Nakai, T.A. Storm, M.A. Kay, Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo, *J. Virol.* 74 (2000) 9451–9463.
- [352] Y. Song, H.H. Lou, J.L. Boyer, M.P. Limberis, L.H. Vandenberghe, N.R. Hackett, et al., Functional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in cystic fibrosis airway epithelial cells by AAV6.2-mediated segmental trans-splicing, *Hum. Gene Ther.* 20 (2009) 267–281. doi:10.1089/hum.2008.173.

Références Bibliographiques

- [353] L.S. Ostedgaard, T. Rokhlina, P.H. Karp, P. Lashmit, S. Afione, M. Schmidt, et al., A shortened adeno-associated virus expression cassette for CFTR gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 2952–2957. doi:10.1073/pnas.0409845102.
- [354] C. Mueller, D. Torrez, S. Braag, A. Martino, T. Clarke, M. Campbell-Thompson, et al., Partial correction of the CFTR-dependent ABPA mouse model with recombinant adeno-associated virus gene transfer of truncated CFTR gene, *J. Gene Med.* 10 (2008) 51–60. doi:10.1002/jgm.1119.
- [355] C.L. Halbert, S.-L. Lam, A.D. Miller, High-efficiency promoter-dependent transduction by adeno-associated virus type 6 vectors in mouse lung, *Hum. Gene Ther.* 18 (2007) 344–354. doi:10.1089/hum.2006.182.
- [356] S.E. Beck, L.A. Jones, K. Chesnut, S.M. Walsh, T.C. Reynolds, B.J. Carter, et al., Repeated delivery of adeno-associated virus vectors to the rabbit airway, *J. Virol.* 73 (1999) 9446–9455.
- [357] C.L. Halbert, T.A. Standaert, M.L. Aitken, I.E. Alexander, D.W. Russell, A.D. Miller, Transduction by adeno-associated virus vectors in the rabbit airway: efficiency, persistence, and readministration, *J. Virol.* 71 (1997) 5932–5941.
- [358] C.L. Halbert, E.A. Rutledge, J.M. Allen, D.W. Russell, A.D. Miller, Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes, *J. Virol.* 74 (2000) 1524–1532.
- [359] X. Liu, M. Luo, C. Guo, Z. Yan, Y. Wang, J.F. Engelhardt, Comparative biology of rAAV transduction in ferret, pig and human airway epithelia, *Gene Ther.* 14 (2007) 1543–1548. doi:10.1038/sj.gt.3303014.
- [360] C.M. Wei, M. Gibson, P.G. Spear, E.M. Scolnick, Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1, *J. Virol.* 39 (1981) 935–944.
- [361] V. Dardalhon, S. Jaleco, C. Rebouissou, C. Ferrand, N. Skander, L. Swainson, et al., Highly efficient gene transfer in naive human T cells with a murine leukemia virus-based vector, *Blood.* 96 (2000) 885–893.
- [362] N.-B. Woods, A. Muessig, M. Schmidt, J. Flygare, K. Olsson, P. Salmon, et al., Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis, *Blood.* 101 (2003) 1284–1289. doi:10.1182/blood-2002-07-2238.
- [363] S. Brenner, H.L. Malech, Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy, *Biochim. Biophys. Acta.* 1640 (2003) 1–24.
- [364] S. Hacein-Bey-Abina, C. von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, et al., A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 255–256. doi:10.1056/NEJM200301163480314.
- [365] A.M. Sinclair, Y.P. Agrawal, E. Elbar, R. Agrawal, A.D. Ho, F. Levine, Interaction of vesicular stomatitis virus-G pseudotyped retrovirus with CD34+ and CD34+ CD38- hematopoietic progenitor cells, *Gene Ther.* 4 (1997) 918–927. doi:10.1038/sj.gt.3300479.
- [366] M. Movassagh, C. Desmyter, C. Baillou, S. Chapel-Fernandes, M. Guigon, D. Klatzmann, et al., High-level gene transfer to cord blood progenitors using gibbon ape leukemia virus pseudotype retroviral vectors and an improved clinically applicable protocol, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998) 225–234. doi:10.1089/hum.1998.9.2-225.
- [367] F.L. Cosset, S.J. Russell, Targeting retrovirus entry, *Gene Ther.* 3 (1996) 946–956.
- [368] M.M. Segura, M. Mangion, B. Gaillet, A. Garnier, New developments in lentiviral vector design, production and purification, *Expert Opin. Biol. Ther.* 13 (2013) 987–1011. doi:10.1517/14712598.2013.779249.
- [369] T. Sakuma, M.A. Barry, Y. Ikeda, Lentiviral vectors: basic to translational, *Biochem. J.* 443 (2012) 603–618. doi:10.1042/BJ20120146.

Références Bibliographiques

- [370] U. Griesenbach, K.M. Pytel, E.W.F.W. Alton, Cystic Fibrosis Gene Therapy in the UK and Elsewhere, *Hum. Gene Ther.* 26 (2015) 266–275. doi:10.1089/hum.2015.027.
- [371] A. Aiuti, L. Biasco, S. Scaramuzza, F. Ferrua, M.P. Cicalese, C. Baricordi, et al., Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome, *Science*. 341 (2013) 1233151. doi:10.1126/science.1233151.
- [372] A. Biffi, E. Montini, L. Lorioli, M. Cesani, F. Fumagalli, T. Plati, et al., Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy, *Science*. 341 (2013) 1233158. doi:10.1126/science.1233158.
- [373] S. Palfi, J.M. Gurruchaga, G.S. Ralph, H. Lepetit, S. Lavisse, P.C. Buttery, et al., Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial, *Lancet Lond. Engl.* 383 (2014) 1138–1146. doi:10.1016/S0140-6736(13)61939-X.
- [374] J.M. Wilson, Adeno-associated virus and lentivirus pseudotypes for lung-directed gene therapy, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1 (2004) 309–314. doi:10.1513/pats.200409-041MS.
- [375] E. Copreni, M. Penzo, S. Carrabino, M. Conese, Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium: a promising approach to gene therapy of cystic fibrosis, *Gene Ther.* 11 Suppl 1 (2004) S67–75. doi:10.1038/sj.gt.3302372.
- [376] P. Cmielewski, D.S. Anson, D.W. Parsons, Lysophosphatidylcholine as an adjuvant for lentiviral vector mediated gene transfer to airway epithelium: effect of acyl chain length, *Respir. Res.* 11 (2010) 84. doi:10.1186/1465-9921-11-84.
- [377] M. Patel, A.M. Giddings, J. Sechelski, J.C. Olsen, High efficiency gene transfer to airways of mice using influenza hemagglutinin pseudotyped lentiviral vectors, *J. Gene Med.* 15 (2013) 51–62. doi:10.1002/jgm.2695.
- [378] P.L. Sinn, A.J. Shah, M.D. Donovan, P.B. McCray, Viscoelastic gel formulations enhance airway epithelial gene transfer with viral vectors, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32 (2005) 404–410. doi:10.1165/rcmb.2004-0410OC.
- [379] M. Kobayashi, A. Iida, Y. Ueda, M. Hasegawa, Pseudotyped lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus SIVagm with envelope glycoproteins from paramyxovirus, *J. Virol.* 77 (2003) 2607–2614.
- [380] S. Ferrari, U. Griesenbach, A. Iida, R. Farley, A.M. Wright, J. Zhu, et al., Sendai virus-mediated CFTR gene transfer to the airway epithelium, *Gene Ther.* 14 (2007) 1371–1379. doi:10.1038/sj.gt.3302991.
- [381] M. Limberis, D.S. Anson, M. Fuller, D.W. Parsons, Recovery of airway cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in mice with cystic fibrosis after single-dose lentivirus-mediated gene transfer, *Hum. Gene Ther.* 13 (2002) 1961–1970. doi:10.1089/10430340260355365.
- [382] A.G. Stocker, K.L. Kremer, R. Koldej, D.S. Miller, D.S. Anson, D.W. Parsons, Single-dose lentiviral gene transfer for lifetime airway gene expression, *J. Gene Med.* 11 (2009) 861–867. doi:10.1002/jgm.1368.
- [383] K. Mitomo, U. Griesenbach, M. Inoue, L. Somerton, C. Meng, E. Akiba, et al., Toward Gene Therapy for Cystic Fibrosis Using a Lentivirus Pseudotyped With Sendai Virus Envelopes, *Mol. Ther.* 18 (2010) 1173–1182. doi:10.1038/mt.2010.13.
- [384] E.L. Rawlins, B.L.M. Hogan, Ciliated epithelial cell lifespan in the mouse trachea and lung, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 295 (2008) L231–234. doi:10.1152/ajplung.90209.2008.
- [385] P.L. Sinn, A.C. Arias, K.A. Brogden, P.B. McCray, Lentivirus vector can be readministered to nasal epithelia without blocking immune responses, *J. Virol.* 82 (2008) 10684–10692. doi:10.1128/JVI.00227-08.
- [386] M.G. Katz, A.S. Fargnoli, C.R. Bridges, Myocardial Gene Transfer: Routes and Devices for Regulation of Transgene Expression by Modulation of Cellular Permeability, *Hum. Gene Ther.* 24 (2013) 375–392. doi:10.1089/hum.2012.241.

Références Bibliographiques

- [387] U.R. Hengge, E.F. Chan, R.A. Foster, P.S. Walker, J.C. Vogel, Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA, *Nat. Genet.* 10 (1995) 161–166. doi:10.1038/ng0695-161.
- [388] J.A. Wolff, R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, et al., Direct gene transfer into mouse muscle in vivo, *Science.* 247 (1990) 1465–1468.
- [389] Q.L. Lu, G. Bou-Gharios, T.A. Partridge, Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory, *Gene Ther.* 10 (2003) 131–142. doi:10.1038/sj.gt.3301874.
- [390] X. Wang, H.-D. Liang, B. Dong, Q.-L. Lu, M.J.K. Blomley, Gene transfer with microbubble ultrasound and plasmid DNA into skeletal muscle of mice: comparison between commercially available microbubble contrast agents, *Radiology.* 237 (2005) 224–229. doi:10.1148/radiol.2371040805.
- [391] M. Moreno-Igoa, R. Manzano, S. Oliván, A.C. Calvo, J.M. Toivonen, R. Osta, Effects of gene therapy on muscle 18S rRNA expression in mouse model of ALS, *BMC Res. Notes.* 3 (2010) 275. doi:10.1186/1756-0500-3-275.
- [392] R.I. Mahato, Non-viral peptide-based approaches to gene delivery, *J. Drug Target.* 7 (1999) 249–268. doi:10.3109/10611869909085509.
- [393] B.E. Houk, R. Martin, G. Hochhaus, J.A. Hughes, Pharmacokinetics of plasmid DNA in the rat, *Pharm. Res.* 18 (2001) 67–74.
- [394] K. Selmaj, C. Kowal, A. Walczak, J. Nowicka, C.S. Raine, Naked DNA vaccination differentially modulates autoimmune responses in experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neuroimmunol.* 111 (2000) 34–44.
- [395] M.Y. Levy, L.G. Barron, K.B. Meyer, F.C. Szoka, Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood, *Gene Ther.* 3 (1996) 201–211.
- [396] A.M. Krieg, Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy, *J. Gene Med.* 1 (1999) 56–63. doi:10.1002/(SICI)1521-2254(199901/02)1:1<56::AID-JGM5>3.0.CO;2-6.
- [397] F. Liu, Y. Song, D. Liu, Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA, *Gene Ther.* 6 (1999) 1258–1266. doi:10.1038/sj.gt.3300947.
- [398] G. Zhang, V. Budker, J.A. Wolff, High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 1735–1737. doi:10.1089/10430349950017734.
- [399] H. Maruyama, N. Higuchi, Y. Nishikawa, S. Kameda, N. Iino, J.J. Kazama, et al., High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection, *J. Gene Med.* 4 (2002) 333–341. doi:10.1002/jgm.281.
- [400] X. Zhang, X. Dong, G.J. Sawyer, L. Collins, J.W. Fabre, Regional hydrodynamic gene delivery to the rat liver with physiological volumes of DNA solution, *J. Gene Med.* 6 (2004) 693–703. doi:10.1002/jgm.595.
- [401] T. Niidome, L. Huang, Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors, *Gene Ther.* 9 (2002) 1647–1652. doi:10.1038/sj.gt.3301923.
- [402] J. Hagstrom, A Facile Nonviral Method for Delivering Genes and siRNAs to Skeletal Muscle of Mammalian Limbs, *Mol. Ther.* 10 (2004) 386–398. doi:10.1016/j.ymthe.2004.05.004.
- [403] H. Herweijer, J.A. Wolff, Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery, *Gene Ther.* 14 (2007) 99–107. doi:10.1038/sj.gt.3302891.
- [404] H. Toumi, J. Hegge, V. Subbotin, M. Noble, H. Herweijer, T. Best, et al., Rapid Intravascular Injection into Limb Skeletal Muscle: A Damage Assessment Study, *Mol. Ther.* 13 (2006) 229–236. doi:10.1016/j.ymthe.2005.07.699.
- [405] G. Zhang, C.I. Wooddell, J.O. Hegge, J.B. Griffin, T. Huss, S. Braun, et al., Functional Efficacy of Dystrophin Expression from Plasmids Delivered to *mdx* Mice by Hydrodynamic Limb Vein Injection, *Hum. Gene Ther.* 21 (2010) 221–237. doi:10.1089/hum.2009.133.
- [406] C. Qiao, J. Li, H. Zheng, J. Bogan, J. Li, Z. Yuan, et al., Hydrodynamic Limb Vein Injection of Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vector Carrying Canine Myostatin Propeptide Gene into

Références Bibliographiques

- Normal Dogs Enhances Muscle Growth, *Hum. Gene Ther.* 20 (2009) 1–10. doi:10.1089/hum.2008.135.
- [407] J.O. Hegge, C.I. Wooddell, G. Zhang, J.E. Hagstrom, S. Braun, T. Huss, et al., Evaluation of Hydrodynamic Limb Vein Injections in Nonhuman Primates, *Hum. Gene Ther.* 21 (2010) 829–842. doi:10.1089/hum.2009.172.
- [408] Z. Fan, K. Kocis, R. Valley, J.F. Howard, M. Chopra, H. An, et al., Safety and Feasibility of High-pressure Transvenous Limb Perfusion With 0.9% Saline in Human Muscular Dystrophy, *Mol. Ther.* 20 (2012) 456–461. doi:10.1038/mt.2011.137.
- [409] T. Suda, K. Suda, D. Liu, Computer-assisted hydrodynamic gene delivery, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16 (2008) 1098–1104. doi:10.1038/mt.2008.66.
- [410] R.M. Klein, E.D. Wolf, R. Wu, J.C. Sanford, High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987, *Biotechnol. Read. Mass.* 24 (1992) 384–386.
- [411] N.S. Yang, J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell, D. McCabe, In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 9568–9572.
- [412] R.S. Williams, S.A. Johnston, M. Riedy, M.J. DeVit, S.G. McElligott, J.C. Sanford, Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 2726–2730.
- [413] P.-W. Lee, S.-F. Peng, C.-J. Su, F.-L. Mi, H.-L. Chen, M.-C. Wei, et al., The use of biodegradable polymeric nanoparticles in combination with a low-pressure gene gun for transdermal DNA delivery, *Biomaterials.* 29 (2008) 742–751. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.10.034.
- [414] A.T. Larregina, S.C. Watkins, G. Erdos, L.A. Spencer, W.J. Storkus, D. Beer Stolz, et al., Direct transfection and activation of human cutaneous dendritic cells, *Gene Ther.* 8 (2001) 608–617. doi:10.1038/sj.gt.3301404.
- [415] H.M. de Wit, E.E.C. Engwerda, C.J. Tack, B.E. de Galan, Insulin administered by needle-free jet injection corrects marked hyperglycaemia faster in overweight or obese patients with diabetes, *Diabetes Obes. Metab.* (2015). doi:10.1111/dom.12550.
- [416] M.M. Coughlin, M. Collins, G. Saxon, C. Jarrahan, D. Zehrung, C. Cappello, et al., Effect of jet injection on infectivity of measles, mumps, and rubella vaccine in a bench model, *Vaccine.* 33 (2015) 4540–4547. doi:10.1016/j.vaccine.2015.07.013.
- [417] S. Mitragotri, Current status and future prospects of needle-free liquid jet injectors, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 543–548. doi:10.1038/nrd2076.
- [418] Y. Peng, P. Masson, P.S. Li, Y. Chang, L. Tian, R. Lee, et al., No-needle local anesthesia for adult male circumcision, *J. Urol.* 184 (2010) 978–983. doi:10.1016/j.juro.2010.04.080.
- [419] W. Walther, U. Stein, I. Fichtner, L. Malcherek, M. Lemm, P.M. Schlag, Nonviral in vivo gene delivery into tumors using a novel low volume jet-injection technology, *Gene Ther.* 8 (2001) 173–180. doi:10.1038/sj.gt.3301350.
- [420] W. Walther, U. Stein, I. Fichtner, D. Kobelt, J. Aumann, F. Arlt, et al., Nonviral jet-injection gene transfer for efficient in vivo cytosine deaminase suicide gene therapy of colon carcinoma, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 12 (2005) 1176–1184. doi:10.1016/j.ymthe.2005.07.700.
- [421] W. Walther, R. Siegel, D. Kobelt, T. Knösel, M. Dietel, A. Bembenek, et al., Novel jet-injection technology for nonviral intratumoral gene transfer in patients with melanoma and breast cancer, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14 (2008) 7545–7553. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0412.
- [422] J.-I. Imoto, E. Konishi, Needle-free jet injection of a mixture of Japanese encephalitis DNA and protein vaccines: a strategy to effectively enhance immunogenicity of the DNA vaccine in a murine model, *Viral Immunol.* 18 (2005) 205–212. doi:10.1089/vim.2005.18.205.
- [423] J. Imoto, T. Ishikawa, A. Yamanaka, M. Konishi, K. Murakami, T. Shibahara, et al., Needle-free jet injection of small doses of Japanese encephalitis DNA and inactivated vaccine mixture induces neutralizing antibodies in miniature pigs and protects against fetal death and

Références Bibliographiques

- mummification in pregnant sows, *Vaccine*. 28 (2010) 7373–7380.
doi:10.1016/j.vaccine.2010.09.008.
- [424] Y. Michinaka, S. Mitragotri, Delivery of polymeric particles into skin using needle-free liquid jet injectors, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 153 (2011) 249–254.
doi:10.1016/j.jconrel.2011.03.024.
- [425] H.J. Kim, J.F. Greenleaf, R.R. Kinnick, J.T. Bronk, M.E. Bolander, Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) 1339–1346.
doi:10.1089/hum.1996.7.11-1339.
- [426] P. Schratzberger, J.G. Krainin, G. Schratzberger, M. Silver, H. Ma, M. Kearney, et al., Transcutaneous ultrasound augments naked DNA transfection of skeletal muscle, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 6 (2002) 576–583.
- [427] Q.L. Lu, H.-D. Liang, T. Partridge, M.J.K. Blomley, Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage, *Gene Ther.* 10 (2003) 396–405. doi:10.1038/sj.gt.3301913.
- [428] D.L. Miller, J. Song, Tumor growth reduction and DNA transfer by cavitation-enhanced high-intensity focused ultrasound in vivo, *Ultrasound Med. Biol.* 29 (2003) 887–893.
- [429] Y.S. Li, E. Davidson, C.N. Reid, A.P. McHale, Optimising ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) in vitro and prolonged expression of a transgene in vivo: potential applications for gene therapy of cancer, *Cancer Lett.* 273 (2009) 62–69. doi:10.1016/j.canlet.2008.07.030.
- [430] A.J. Fischer, J.J. Stanke, G. Omar, C.C. Askwith, R.W. Burry, Ultrasound-mediated gene transfer into neuronal cells, *J. Biotechnol.* 122 (2006) 393–411. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.10.006.
- [431] S. Tsunoda, O. Mazda, Y. Oda, Y. Iida, S. Akabame, T. Kishida, et al., Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 (2005) 118–127. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.052.
- [432] S. Chen, J. Ding, R. Bekeredjian, B. Yang, R.V. Shohet, S.A. Johnston, et al., Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 8469–8474. doi:10.1073/pnas.0602921103.
- [433] D.L. Miller, S.V. Pislaru, J.E. Greenleaf, Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation, *Somat. Cell Mol. Genet.* 27 (2002) 115–134.
- [434] C.S. Yoon, J.H. Park, Ultrasound-mediated gene delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 321–330. doi:10.1517/17425241003596329.
- [435] C.X. Deng, F. Sieling, H. Pan, J. Cui, Ultrasound-induced cell membrane porosity, *Ultrasound Med. Biol.* 30 (2004) 519–526. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2004.01.005.
- [436] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P.H. Hofschneider, Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields, *EMBO J.* 1 (1982) 841–845.
- [437] V. Laurent, A. Fraix, T. Montier, S. Cammas-Marion, C. Ribault, T. Benvegno, et al., Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells: New means for drug metabolism and toxicity studies, *Biotechnol. J.* 5 (2010) 314–320. doi:10.1002/biot.200900255.
- [438] L.C. Heller, R. Heller, Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma, *Curr. Gene Ther.* 10 (2010) 312–317.
- [439] P. Chiarella, V.M. Fazio, E. Signori, Application of electroporation in DNA vaccination protocols, *Curr. Gene Ther.* 10 (2010) 281–286.
- [440] I.A. Pringle, G. McLachlan, D.D.S. Collie, S.G. Sumner-Jones, A.E. Lawton, P. Tennant, et al., Electroporation enhances reporter gene expression following delivery of naked plasmid DNA to the lung, *J. Gene Med.* 9 (2007) 369–380. doi:10.1002/jgm.1026.
- [441] F. Scherer, M. Anton, U. Schillinger, J. Henke, C. Bergemann, A. Krüger, et al., Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo, *Gene Ther.* 9 (2002) 102–109. doi:10.1038/sj.gt.3301624.
- [442] C. Plank, O. Zelphati, O. Mykhaylyk, Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 1300–1331. doi:10.1016/j.addr.2011.08.002.

Références Bibliographiques

- [443] M. Pickard, D. Chari, Enhancement of magnetic nanoparticle-mediated gene transfer to astrocytes by “magnetofection”: effects of static and oscillating fields, *Nanomed.* 5 (2010) 217–232. doi:10.2217/nnm.09.109.
- [444] M.R. Pickard, P. Barraud, D.M. Chari, The transfection of multipotent neural precursor/stem cell transplant populations with magnetic nanoparticles, *Biomaterials.* 32 (2011) 2274–2284. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.007.
- [445] G. Hasenpusch, J. Geiger, K. Wagner, O. Mykhaylyk, F. Wiekhorst, L. Trahms, et al., Magnetized aerosols comprising superparamagnetic iron oxide nanoparticles improve targeted drug and gene delivery to the lung, *Pharm. Res.* 29 (2012) 1308–1318. doi:10.1007/s11095-012-0682-z.
- [446] C. Pichon, L. Billiet, P. Midoux, Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking, *Curr. Opin. Biotechnol.* 21 (2010) 640–645. doi:10.1016/j.copbio.2010.07.003.
- [447] D.R. Gill, I.A. Pringle, S.C. Hyde, Progress and prospects: the design and production of plasmid vectors, *Gene Ther.* 16 (2009) 165–171. doi:10.1038/gt.2008.183.
- [448] G. Poste, D. Papahadjopoulos, W.J. Vail, Lipid vesicles as carriers for introducing biologically active materials into cells, *Methods Cell Biol.* 14 (1976) 33–71.
- [449] G. Gregoriadis, Targeting of drugs, *Nature.* 265 (1977) 407–411.
- [450] M.J. Ostro, D. Giacomoni, D. Lavelle, W. Paxton, S. Dray, Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposome-mediated insertion into a human cell line, *Nature.* 274 (1978) 921–923.
- [451] G.J. Dimitriadis, Introduction of ribonucleic acids into cells by means of liposomes, *Nucleic Acids Res.* 5 (1978) 1381–1386.
- [452] G.J. Dimitriadis, Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes, *Nature.* 274 (1978) 923–924.
- [453] R.T. Fraley, C.S. Fornari, S. Kaplan, Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: potential for gene transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (1979) 3348–3352.
- [454] R. Fraley, J. Wilschut, N. Düzgüneş, C. Smith, D. Papahadjopoulos, Studies on the mechanism of membrane fusion: role of phosphate in promoting calcium ion induced fusion of phospholipid vesicles, *Biochemistry (Mosc.).* 19 (1980) 6021–6029.
- [455] A.B. Mukherjee, S. Orloff, J.D. Butler, T. Triche, P. Lalley, J.D. Schulman, Entrapment of metaphase chromosomes into phospholipid vesicles (lipochromosomes): carrier potential in gene transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75 (1978) 1361–1365.
- [456] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, et al., Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 7413–7417.
- [457] J.P. Behr, B. Demeneix, J.P. Loeffler, J. Perez-Mutul, Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 6982–6986.
- [458] L. Stamatatos, R. Leventis, M.J. Zuckermann, J.R. Silvius, Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes, *Biochemistry (Mosc.).* 27 (1988) 3917–3925.
- [459] R. Leventis, J.R. Silvius, Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1023 (1990) 124–132. doi:10.1016/0005-2736(90)90017-I.
- [460] J.H. Felgner, R. Kumar, C.N. Sridhar, C.J. Wheeler, Y.J. Tsai, R. Border, et al., Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 2550–2561.
- [461] H. San, Z.Y. Yang, V.J. Pompili, M.L. Jaffe, G.E. Plautz, L. Xu, et al., Safety and short-term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy, *Hum. Gene Ther.* 4 (1993) 781–788. doi:10.1089/hum.1993.4.6-781.

Références Bibliographiques

- [462] I. van der Woude, A. Wagenaar, A.A. Meekel, M.B. ter Beest, M.H. Ruiters, J.B. Engberts, et al., Novel pyridinium surfactants for efficient, nontoxic in vitro gene delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 1160–1165.
- [463] P. Hawley-Nelson, V. Ciccarone, G. Gedeyehu, J. Jessee, P.L. Felgner, Lipofectamine reagent : a new higher efficiency polycationic liposome transfection reagent, *Focus.* 15 (1993) 73–78.
- [464] Z. Huang, F.C. Szoka, Sterol-modified phospholipids: cholesterol and phospholipid chimeras with improved biomembrane properties, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 15702–15712. doi:10.1021/ja8065557.
- [465] X. Gao, L. Huang, A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179 (1991) 280–285. doi:10.1016/0006-291X(91)91366-K.
- [466] S.C. Hyde, K.W. Southern, U. Gileadi, E.M. Fitzjohn, K.A. Mofford, B.E. Waddell, et al., Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis, *Gene Ther.* 7 (2000) 1156–1165.
- [467] J.P. Vigneron, N. Oudrhiri, M. Fauquet, L. Vergely, J.C. Bradley, M. Basseville, et al., Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 9682–9686.
- [468] N. Oudrhiri, J.P. Vigneron, M. Peuchmaur, T. Leclerc, J.M. Lehn, P. Lehn, Gene transfer by guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial cells in vitro and in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 1651–1656.
- [469] D. Luton, N. Oudrhiri, P. de Lagausie, A. Aissaoui, M. Hauchecorne, S. Julia, et al., Gene transfection into fetal sheep airways in utero using guanidinium-cholesterol cationic lipids, *J. Gene Med.* 6 (2004) 328–336. doi:10.1002/jgm.559.
- [470] C.L. Densmore, T.H. Giddings, J.C. Waldrep, B.M. Kinsey, V. Knight, Gene transfer by guanidinium-cholesterol: dioleoylphosphatidyl-ethanolamine liposome-DNA complexes in aerosol, *J. Gene Med.* 1 (1999) 251–264. doi:10.1002/(SICI)1521-2254(199907/08)1:4<251::AID-JGM43>3.0.CO;2-Z.
- [471] E.R. Lee, J. Marshall, C.S. Siegel, C. Jiang, N.S. Yew, M.R. Nichols, et al., Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) 1701–1717. doi:10.1089/hum.1996.7.14-1701.
- [472] E.W. Alton, M. Stern, R. Farley, A. Jaffe, S.L. Chadwick, J. Phillips, et al., Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial, *Lancet Lond. Engl.* 353 (1999) 947–954.
- [473] E.W.F.W. Alton, A.C. Boyd, S.H. Cheng, J.C. Davies, L.A. Davies, A. Dayan, et al., Toxicology study assessing efficacy and safety of repeated administration of lipid/DNA complexes to mouse lung, *Gene Ther.* 21 (2014) 89–95. doi:10.1038/gt.2013.61.
- [474] E.W. Alton, A. Baker, E. Baker, A.C. Boyd, S.H. Cheng, R.L. Coles, et al., The safety profile of a cationic lipid-mediated cystic fibrosis gene transfer agent following repeated monthly aerosol administration to sheep, *Biomaterials.* 34 (2013) 10267–10277. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.023.
- [475] G. McLachlan, H. Davidson, E. Holder, L.A. Davies, I.A. Pringle, S.G. Sumner-Jones, et al., Pre-clinical evaluation of three non-viral gene transfer agents for cystic fibrosis after aerosol delivery to the ovine lung, *Gene Ther.* 18 (2011) 996–1005. doi:10.1038/gt.2011.55.
- [476] L.A. Davies, C. Seguela, A. Varathalingam, S.H. Cheng, S.C. Hyde, D.R. Gill, Identification of transfected cell types following non-viral gene transfer to the murine lung, *J. Gene Med.* 9 (2007) 184–196. doi:10.1002/jgm.1007.
- [477] O. Boussif, F. Lezoualc’h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, et al., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, *Proc Natl Acad Sci USA.* 92 (1995) 7297–7301.
- [478] S. Ferrari, E. Moro, A. Pettenazzo, J.P. Behr, F. Zacchello, M. Scarpa, ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo, *Gene Ther.* 4 (1997) 1100–1106. doi:10.1038/sj.gt.3300503.

Références Bibliographiques

- [479] N.D. Sonawane, F.C. Szoka, A.S. Verkman, Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 44826–44831. doi:10.1074/jbc.M308643200.
- [480] G. Zuber, E. Dauty, M. Nothisen, P. Belguise, J.P. Behr, Towards synthetic viruses, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52 (2001) 245–253.
- [481] T. Bieber, W. Meissner, S. Kostin, A. Niemann, H.-P. Elsasser, Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 82 (2002) 441–454.
- [482] A. Akinc, M. Thomas, A.M. Klibanov, R. Langer, Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis, *J. Gene Med.* 7 (2005) 657–663. doi:10.1002/jgm.696.
- [483] M. Thomas, A.M. Klibanov, Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 14640–14645. doi:10.1073/pnas.192581499.
- [484] J.P. Clamme, J. Azoulay, Y. Mély, Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* 84 (2003) 1960–1968. doi:10.1016/S0006-3495(03)75004-8.
- [485] S. Zhang, Y. Xu, B. Wang, W. Qiao, D. Liu, Z. Li, Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 100 (2004) 165–180. doi:10.1016/j.jconrel.2004.08.019.
- [486] S. Boeckle, K. von Gersdorff, S. van der Piepen, C. Culmsee, E. Wagner, M. Ogris, Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer, *J. Gene Med.* 6 (2004) 1102–1111. doi:10.1002/jgm.598.
- [487] W.T. Godbey, K.K. Wu, A.G. Mikos, Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle, *J. Biomed. Mater. Res.* 45 (1999) 268–275.
- [488] D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H.P. Elsässer, T. Kissel, A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1273–1279.
- [489] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis, *Biomaterials.* 24 (2003) 1121–1131.
- [490] M. Neu, D. Fischer, T. Kissel, Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives, *J. Gene Med.* 7 (2005) 992–1009. doi:10.1002/jgm.773.
- [491] D.D. Dunlap, A. Maggi, M.R. Soria, L. Monaco, Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3095–3101.
- [492] T. Reschel, C. Konák, D. Oupický, L.W. Seymour, K. Ulbrich, Physical properties and in vitro transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 81 (2002) 201–217.
- [493] K. Kunath, A. von Harpe, D. Fischer, H. Petersen, U. Bickel, K. Voigt, et al., Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 89 (2003) 113–125.
- [494] A. Gautam, C.L. Densmore, E. Golunski, B. Xu, J.C. Waldrep, Transgene expression in mouse airway epithelium by aerosol gene therapy with PEI-DNA complexes, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 3 (2001) 551–556. doi:10.1006/mthe.2001.0300.
- [495] L.A. Davies, S.C. Hyde, G. Nunez-Alonso, R.P. Bazzani, R. Harding-Smith, I.A. Pringle, et al., The use of CpG-free plasmids to mediate persistent gene expression following repeated aerosol delivery of pDNA/PEI complexes, *Biomaterials.* 33 (2012) 5618–5627. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.04.019.

Références Bibliographiques

- [496] G. McLachlan, H. Davidson, E. Holder, L.A. Davies, I.A. Pringle, S.G. Sumner-Jones, et al., Pre-clinical evaluation of three non-viral gene transfer agents for cystic fibrosis after aerosol delivery to the ovine lung, *Gene Ther.* 18 (2011) 996–1005. doi:10.1038/gt.2011.55.
- [497] C. Densmore, Aerosol Delivery of Robust Polyethyleneimine– DNA Complexes for Gene Therapy and Genetic Immunization, *Mol. Ther.* 1 (2000) 180–188. doi:10.1006/mthe.1999.0021.
- [498] C. Rudolph, R.H. Müller, J. Rosenecker, Jet nebulization of PEI/DNA polyplexes: physical stability and in vitro gene delivery efficiency, *J. Gene Med.* 4 (2002) 66–74.
- [499] A.N. Uduehi, U. Stammberger, B. Kubisa, M. Gugger, T.A. Buehler, R.A. Schmid, Effects of linear polyethylenimine and polyethylenimine/DNA on lung function after airway instillation to rat lungs, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 4 (2001) 52–57. doi:10.1006/mthe.2001.0413.
- [500] S.P. Wong, O. Argyros, S.J. Howe, R.P. Harbottle, Systemic gene transfer of polyethylenimine (PEI)-plasmid DNA complexes to neonatal mice, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 150 (2011) 298–306. doi:10.1016/j.jconrel.2010.12.010.
- [501] A. Bragonzi, G. Dina, A. Villa, G. Calori, A. Biffi, C. Bordignon, et al., Biodistribution and transgene expression with nonviral cationic vector/DNA complexes in the lungs, *Gene Ther.* 7 (2000) 1753–1760. doi:10.1038/sj.gt.3301282.
- [502] P. Chollet, M.C. Favrot, A. Hurbin, J.-L. Coll, Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes, *J. Gene Med.* 4 (2002) 84–91.
- [503] H.L. Kutscher, P. Chao, M. Deshmukh, Y. Singh, P. Hu, L.B. Joseph, et al., Threshold size for optimal passive pulmonary targeting and retention of rigid microparticles in rats, *J. Controlled Release.* 143 (2010) 31–37. doi:10.1016/j.jconrel.2009.12.019.
- [504] T. Kurosaki, T. Kitahara, S. Fumoto, K. Nishida, J. Nakamura, T. Niidome, et al., Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and γ -polyglutamic acid for gene delivery systems, *Biomaterials.* 30 (2009) 2846–2853. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.01.055.
- [505] J. Sun, F. Zeng, H. Jian, S. Wu, Conjugation with betaine: a facile and effective approach to significant improvement of gene delivery properties of PEI, *Biomacromolecules.* 14 (2013) 728–736. doi:10.1021/bm301826m.
- [506] K. Kunath, T. Merdan, O. Hegener, H. Häberlein, T. Kissel, Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer, *J. Gene Med.* 5 (2003) 588–599. doi:10.1002/jgm.382.
- [507] A.C. Roche, I. Fajac, S. Grosse, N. Frison, C. Rondanino, R. Mayer, et al., Glycofection: facilitated gene transfer by cationic glycopolymers, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 60 (2003) 288–297.
- [508] S. Grosse, Y. Aron, I. Honoré, G. Thévenot, C. Danel, A.-C. Roche, et al., Lactosylated polyethylenimine for gene transfer into airway epithelial cells: role of the sugar moiety in cell delivery and intracellular trafficking of the complexes, *J. Gene Med.* 6 (2004) 345–356. doi:10.1002/jgm.515.
- [509] S. Grosse, G. Thévenot, Y. Aron, E. Duverger, M. Abdelkarim, A.-C. Roche, et al., In vivo gene delivery in the mouse lung with lactosylated polyethylenimine, questioning the relevance of in vitro experiments, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 132 (2008) 105–112. doi:10.1016/j.jconrel.2008.08.018.
- [510] K. Sagara, S.W. Kim, A new synthesis of galactose-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine for gene delivery to hepatocytes, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 79 (2002) 271–281.
- [511] E. Bertrand, C. Gonçalves, L. Billiet, J.P. Gomez, C. Pichon, H. Cheradame, et al., Histidinylated linear PEI: a new efficient non-toxic polymer for gene transfer, *Chem. Commun. Camb. Engl.* 47 (2011) 12547–12549. doi:10.1039/c1cc15716g.
- [512] M.L. Forrest, G.E. Meister, J.T. Koerber, D.W. Pack, Partial acetylation of polyethylenimine enhances in vitro gene delivery, *Pharm. Res.* 21 (2004) 365–371.
- [513] A.M. Doody, J.N. Korley, K.P. Dang, P.N. Zawaneh, D. Putnam, Characterizing the structure/function parameter space of hydrocarbon-conjugated branched polyethylenimine

Références Bibliographiques

- for DNA delivery in vitro, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 116 (2006) 227–237. doi:10.1016/j.jconrel.2006.07.019.
- [514] G.Y. Wu, C.H. Wu, Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 4429–4432.
- [515] D.Y. Kwok, C.C. Coffin, C.P. Lollo, J. Jovenal, M.G. Banaszczyk, P. Mullen, et al., Stabilization of poly-L-lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver, *Biochim. Biophys. Acta.* 1444 (1999) 171–190.
- [516] P. Midoux, M. Monsigny, Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes, *Bioconjug. Chem.* 10 (1999) 406–411. doi:10.1021/bc9801070.
- [517] B. Brissault, C. Leborgne, C. Guis, O. Danos, H. Cheradame, A. Kichler, Linear topology confers in vivo gene transfer activity to polyethylenimines, *Bioconjug. Chem.* 17 (2006) 759–765. doi:10.1021/bc050287v.
- [518] Y.H. Choi, F. Liu, J.S. Kim, Y.K. Choi, J.S. Park, S.W. Kim, Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 54 (1998) 39–48.
- [519] D. Putnam, C.A. Gentry, D.W. Pack, R. Langer, Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 1200–1205. doi:10.1073/pnas.031577698.
- [520] M. Ohsaki, T. Okuda, A. Wada, T. Hirayama, T. Niidome, H. Aoyagi, In vitro gene transfection using dendritic poly(L-lysine), *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 510–517.
- [521] G. Liu, M. Molas, G.A. Grossmann, M. Pasumarthy, J.C. Perales, M.J. Cooper, et al., Biological properties of poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 34379–34387. doi:10.1074/jbc.M105250200.
- [522] M.A. Wolfert, E.H. Schacht, V. Toncheva, K. Ulbrich, O. Nazarova, L.W. Seymour, Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) 2123–2133. doi:10.1089/hum.1996.7.17-2123.
- [523] Z. Kadlecova, Y. Rajendra, M. Matasci, L. Baldi, D.L. Hacker, F.M. Wurm, et al., DNA delivery with hyperbranched polylysine: a comparative study with linear and dendritic polylysine, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 169 (2013) 276–288. doi:10.1016/j.jconrel.2013.01.019.
- [524] Q. Peng, J. Zhu, Y. Yu, L. Hoffman, X. Yang, Hyperbranched lysine-arginine copolymer for gene delivery, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* (2015) 1–15. doi:10.1080/09205063.2015.1080482.
- [525] K. Shi, Y. Liu, L. Ke, Y. Fang, R. Yang, F. Cui, Epsilon-poly-L-lysine guided improving pulmonary delivery of supramolecular self-assembled insulin nanospheres, *Int. J. Biol. Macromol.* 72 (2015) 1441–1450. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.10.023.
- [526] T. Montier, T. Benvegna, P.-A. Jaffres, J.-J. Yaouanc, P. Lehn, Progress in Cationic Lipid-Mediated Gene Transfection: A Series of Bio-Inspired Lipids as an Example, *Curr. Gene Ther.* 8 (2008) 296–312. doi:10.2174/156652308786070989.
- [527] M. Berchel, T. Le Gall, H. Couthon-Gourvès, J.-P. Haelters, T. Montier, P. Midoux, et al., Lipophosphonate/lipophosphoramidates: A family of synthetic vectors efficient for gene delivery, *Biochimie.* 94 (2012) 33–41. doi:10.1016/j.biochi.2011.07.026.
- [528] G. Le Bolc'h, N. Le Bris, J.-J. Yaouanc, J.-C. Climent, H. des Abbayes, M.-P. Audrèzet, et al., Cationic phosphonolipids as non viral vectors for DNA transfection, *Tetrahedron Lett.* 36 (1995) 6681–6684. doi:10.1016/00404-0399(50)1389-Y.
- [529] F. Lamarche, M. Mével, T. Montier, L. Burel-Deschamps, P. Giamarchi, R. Tripier, et al., Lipophosphoramidates as Lipidic Part of Lipospermines for Gene Delivery, *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 1575–1582. doi:10.1021/bc070070w.
- [530] V. Floch, S. Loisel, E. Guenin, A.C. Hervé, J.C. Clément, J.J. Yaouanc, et al., Cation Substitution in Cationic Phosphonolipids: A New Concept To Improve Transfection Activity and Decrease Cellular Toxicity, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 4617–4628. doi:10.1021/jm000006z.

Références Bibliographiques

- [531] M. Mével, C. Neveu, C. Gonçalves, J.-J. Yaouanc, C. Pichon, P.-A. Jaffrès, et al., Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays, *Chem. Commun.* (2008) 3124. doi:10.1039/b805226c.
- [532] M. Mével, G. Breuzard, J.-J. Yaouanc, J.-C. Clément, P. Lehn, C. Pichon, et al., Synthesis and Transfection Activity of New Cationic Phosphoramidate Lipids: High Efficiency of an Imidazolium Derivative, *ChemBioChem.* 9 (2008) 1462–1471. doi:10.1002/cbic.200700727.
- [533] V. Floch, G. Le Bolc'h, M.P. Audrézet, J.J. Yaouanc, J.C. Clément, H. des Abbayes, et al., Cationic phosphonolipids as non viral vectors for DNA transfection in hematopoietic cell lines and CD34+ cells, *Blood Cells. Mol. Dis.* 23 (1997) 69–87. doi:10.1006/bcmd.1997.0123.
- [534] V. Floch, M.P. Audrezet, C. Guillaume, E. Gobin, G. Le Bolch, J.C. Clement, et al., Transgene expression kinetics after transfection with cationic phosphonolipids in hematopoietic non adherent cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 1371 (1998) 53–70.
- [535] C. Guillaume-Gable, V. Floch, B. Mercier, M.-P. Audrézet, E. Gobin, G. Le Bolc'H, et al., Cationic Phosphonolipids as Nonviral Gene Transfer Agents in the Lungs of Mice, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998) 2309–2319. doi:10.1089/hum.1998.9.16-2309.
- [536] V. Floch, P. Delépine, C. Guillaume, S. Loisel, S. Chassé, G. Le Bolc'h, et al., Systemic administration of cationic phosphonolipids/DNA complexes and the relationship between formulation and lung transfection efficiency, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1464 (2000) 95–103. doi:10.1016/S0005-2736(99)00250-3.
- [537] D. Lichtenberg, E. Freire, C.F. Schmidt, Y. Barenholz, P.L. Felgner, T.E. Thompson, Effect of surface curvature on stability, thermodynamic behavior, and osmotic activity of dipalmitoylphosphatidylcholine single lamellar vesicles, *Biochemistry (Mosc.)*. 20 (1981) 3462–3467.
- [538] N. Düzgüneş, J.A. Goldstein, D.S. Friend, P.L. Felgner, 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 (Mosc.)*. 28 (1989) 9179–9184.
- [539] E. Guénin, A.-C. Hervé, V. Floch, S. Loisel, J.-J. Yaouanc, J.-C. Clément, et al., Cationic Phosphonolipids Containing Quaternary Phosphonium and Arsonium Groups for DNA Transfection with Good Efficiency and Low Cellular Toxicity**, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 629–631. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(20000204)39:3<629::AID-ANIE629>3.0.CO;2-K.
- [540] J. Stekar, G. Nössner, B. Kutscher, J. Engel, P. Hilgard, Synthesis, Antitumor Activity, and Tolerability of Phospholipids Containing Nitrogen Homologues, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34 (1995) 238–240. doi:10.1002/anie.199502381.
- [541] P. Delépine, C. Guillaume, V. Floch, S. Loisel, J. Yaouanc, J. Clément, et al., Cationic phosphonolipids as nonviral vectors: in vitro and in vivo applications, *J. Pharm. Sci.* 89 (2000) 629–638. doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200005)89:5<629::AID-JPS8>3.0.CO;2-P.
- [542] T. Montier, P. Delépine, K. Le Ny, Y. Fichou, M. Le Bris, E. Hardy, et al., KLN-5: a safe monocationic lipophosphoramidate to transfect efficiently haematopoietic cell lines and human CD34+ cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 1665 (2004) 118–133. doi:10.1016/j.bbamem.2004.07.009.
- [543] T. Montier, P. Delépine, R. Marianowski, K. Le Ny, M. Le Bris, D. Gillet, et al., CFTR Transgene Expression in Primary $\Delta F508$ Epithelial Cell Cultures From Human Nasal Polyps Following Gene Transfer With Cationic Phosphonolipids, *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 193–206. doi:10.1385/MB:26:3:193.
- [544] E. Picquet, K. Le Ny, P. Delépine, T. Montier, J.-J. Yaouanc, D. Cartier, et al., Cationic Lipophosphoramidates and Lipophosphoguanidines Are Very Efficient for in Vivo DNA Delivery, *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 1051–1053. doi:10.1021/bc050097k.
- [545] T. Le Gall, D. Loizeau, E. Picquet, N. Carmoy, J.-J. Yaouanc, L. Burel-Deschamps, et al., A Novel Cationic Lipophosphoramidate with Diunsaturated Lipid Chains: Synthesis, Physicochemical Properties, and Transfection Activities, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 1496–1508. doi:10.1021/jm900897a.

Références Bibliographiques

- [546] M.F. Lindberg, T. Le Gall, N. Carmoy, M. Berchel, S.C. Hyde, D.R. Gill, et al., Efficient in vivo transfection and safety profile of a CpG-free and codon optimized luciferase plasmid using a cationic lipophosphoramidate in a multiple intravenous administration procedure, *Biomaterials*. 59 (2015) 1–11. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.04.024.
- [547] V. Allain, C. Bourgaux, P. Couvreur, Self-assembled nucleolipids: from supramolecular structure to soft nucleic acid and drug delivery devices, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 1891–1903. doi:10.1093/nar/gkr681.
- [548] I.S. Zuhorn, U. Bakowsky, E. Polushkin, W.H. Visser, M.C.A. Stuart, J.B.F.N. Engberts, et al., Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 11 (2005) 801–810. doi:10.1016/j.ymthe.2004.12.018.
- [549] R. Koynova, L. Wang, R.C. Macdonald, Cationic phospholipids forming cubic phases: lipoplex structure and transfection efficiency, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 739–744. doi:10.1021/mp800011e.
- [550] J.N. Israelachvili, D.J. Mitchell, B.W. Ninham, Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2.* 72 (1976) 1525. doi:10.1039/f29767201525.
- [551] M.F. Lindberg, N. Carmoy, T. Le Gall, A. Fraix, M. Berchel, C. Lorilleux, et al., The gene transfection properties of a lipophosphoramidate derivative with two phytanyl chains, *Biomaterials*. 33 (2012) 6240–6253. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.014.
- [552] M. Mével, T. Montier, F. Lamarche, P. Delépine, T. Le Gall, J.-J. Yaouanc, et al., Dicationic Lipophosphoramidates as DNA Carriers, *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 1604–1611. doi:10.1021/bc070089z.
- [553] M.F.M. Mustapa, P.C. Bell, C.A. Hurley, A. Nicol, E. Guénin, S. Sarkar, et al., Biophysical characterization of an integrin-targeted lipopolyplex gene delivery vector, *Biochemistry (Mosc.)*. 46 (2007) 12930–12944. doi:10.1021/bi701014y.
- [554] M. Berchel, J.-P. Haelters, H. Couthon-Gourvès, L. Deschamps, P. Midoux, P. Lehn, et al., Modular Construction of Fluorescent Lipophosphoramidates by Click Chemistry, *Eur. J. Org. Chem.* 2011 (2011) 6294–6303. doi:10.1002/ejoc.201100900.
- [555] M. Berchel, J.-P. Haelters, D. Afonso, A. Maroto, L. Deschamps, P. Giamarchi, et al., Functionalized Phospholipid Molecular Platform: Use for Production of Cationic Fluorescent Lipids: Phospholipid Molecular Platform for Cationic Fluorescent Lipids, *Eur. J. Org. Chem.* 2014 (2014) 1076–1083. doi:10.1002/ejoc.201301416.
- [556] D.R. Gill, R.P. Bazzani, S.C. Hyde, Strategies for long-term expression of transgenes in the respiratory epithelium, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12 (2010) 386–393.
- [557] S.C. Hyde, I.A. Pringle, S. Abdullah, A.E. Lawton, L.A. Davies, A. Varathalingam, et al., CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 549–551. doi:10.1038/nbt1399.
- [558] <http://biowiki.mbolduc1.profweb.ca/images/6/6a/Vaisselle.jpg>, (n.d.).
- [559] B. Davies, T. Morris, Physiological parameters in laboratory animals and humans, *Pharm. Res.* 10 (1993) 1093–1095.
- [560] <http://sciencejunior.fr/biologie/le-sang/attachment/cellules-du-sang>, (n.d.).
- [561] J.D. Tousignant, A.L. Gates, L.A. Ingram, C.L. Johnson, J.B. Nietupski, S.H. Cheng, et al., Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice, *Hum. Gene Ther.* 11 (2000) 2493–2513. doi:10.1089/10430340050207984.
- [562] S. David, C. Passirani, N. Carmoy, M. Morille, M. Mevel, B. Chatin, et al., DNA Nanocarriers for Systemic Administration: Characterization and In Vivo Bioimaging in Healthy Mice, *Mol. Ther. — Nucleic Acids*. 2 (2013) e64. doi:10.1038/mtna.2012.56.
- [563] D.A. Groneberg, C. Witt, U. Wagner, K.F. Chung, A. Fischer, Fundamentals of pulmonary drug delivery, *Respir. Med.* 97 (2003) 382–387.

Références Bibliographiques

- [564] R.W. Niven, Delivery of biotherapeutics by inhalation aerosol, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 12 (1995) 151–231.
- [565] C. Rudolph, J. Lausier, S. Naundorf, R.H. Müller, J. Rosenecker, In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers, *J. Gene Med.* 2 (2000) 269–278. doi:10.1002/1521-2254(200007/08)2:4<269::AID-JGM112>3.0.CO;2-F.
- [566] L.S. Uyechi, L. Gagné, G. Thurston, F.C. Szoka, Mechanism of lipoplex gene delivery in mouse lung: binding and internalization of fluorescent lipid and DNA components, *Gene Ther.* 8 (2001) 828–836. doi:10.1038/sj.gt.3301461.
- [567] U. Griesenbach, A. Chonn, R. Cassady, V. Hannam, C. Ackerley, M. Post, et al., Comparison between intratracheal and intravenous administration of liposome-DNA complexes for cystic fibrosis lung gene therapy, *Gene Ther.* 5 (1998) 181–188. doi:10.1038/sj.gt.3300562.
- [568] R. Stribling, E. Brunette, D. Liggitt, K. Gaensler, R. Debs, Aerosol gene delivery in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 11277–11281.
- [569] C. Guillaume, P. Delépine, C. Droal, T. Montier, G. Tymen, F. Claude, Aerosolization of cationic lipid-DNA complexes: lipoplex characterization and optimization of aerosol delivery conditions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286 (2001) 464–471. doi:10.1006/bbrc.2001.5418.
- [570] C.L. Densmore, E.S. Kleinerman, A. Gautam, S.F. Jia, B. Xu, L.L. Worth, et al., Growth suppression of established human osteosarcoma lung metastases in mice by aerosol gene therapy with PEI-p53 complexes, *Cancer Gene Ther.* 8 (2001) 619–627. doi:10.1038/sj.cgt.7700343.
- [571] J. Davies, pulmonary therapy, in: *Pharm. Gene Deliv. Syst.*, In: Rolland, A and Sullivan S M. (eds), Marcel Dekker, New York, 2003.
- [572] M. Ogris, S. Brunner, S. Schuller, R. Kircheis, E. Wagner, PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery, *Gene Ther.* 6 (1999) 595–605.
- [573] M. Bello Roufaï, P. Midoux, Histidylated polylysine as DNA vector: elevation of the imidazole protonation and reduced cellular uptake without change in the polyfection efficiency of serum stabilized negative polyplexes, *Bioconjug. Chem.* 12 (2001) 92–99.
- [574] P. Opanasopit, M. Nishikawa, M. Hashida, Factors affecting drug and gene delivery: effects of interaction with blood components, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 19 (2002) 191–233.
- [575] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 631–651.
- [576] C. Passirani, Complement activation by injectable colloidal drug carriers, *Biomater. Deliv. Target. Proteins Nucleic Acids* CRC Press. (2005) 187–230.
- [577] H.J. Müller-Eberhard, Molecular organization and function of the complement system, *Annu. Rev. Biochem.* 57 (1988) 321–347. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.001541.
- [578] O. Zelphati, L.S. Uyechi, L.G. Barron, F.C. Szoka, Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 1390 (1998) 119–133. doi:10.1016/S0005-2760(97)00169-0.
- [579] G.A. Viglianti, C.M. Lau, T.M. Hanley, B.A. Miko, M.J. Shlomchik, A. Marshak-Rothstein, Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA, *Immunity.* 19 (2003) 837–847.
- [580] J.D. Tousignant, A.L. Gates, L.A. Ingram, C.L. Johnson, J.B. Nietupski, S.H. Cheng, et al., Comprehensive Analysis of the Acute Toxicities Induced by Systemic Administration of Cationic Lipid:Plasmid DNA Complexes in Mice, *Hum. Gene Ther.* 11 (2000) 2493–2513. doi:10.1089/10430340050207984.
- [581] R. Gref, Y. Minamitake, M.T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres, *Science.* 263 (1994) 1600–1603.
- [582] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J.-P. Benoit, Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems, *Biomaterials.* 27 (2006) 4356–4373. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.03.039.

Références Bibliographiques

- [583] P.C. Ross, S.W. Hui, Polyethylene glycol enhances lipoplex-cell association and lipofection, *Biochim. Biophys. Acta.* 1421 (1999) 273–283.
- [584] M. Morille, T. Montier, P. Legras, N. Carmoy, P. Brodin, B. Pitard, et al., Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting, *Biomaterials.* 31 (2010) 321–329. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.044.
- [585] V.C. Mosqueira, P. Legrand, R. Gref, B. Heurtault, M. Appel, G. Barratt, Interactions between a macrophage cell line (J774A1) and surface-modified poly (D,L-lactide) nanocapsules bearing poly(ethylene glycol), *J. Drug Target.* 7 (1999) 65–78. doi:10.3109/10611869909085493.
- [586] S. Hirsjärvi, S. Dufort, J. Gravier, I. Texier, Q. Yan, J. Bibette, et al., Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 9 (2013) 375–387. doi:10.1016/j.nano.2012.08.005.
- [587] S. Mishra, P. Webster, M.E. Davis, PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles, *Eur. J. Cell Biol.* 83 (2004) 97–111. doi:10.1078/0171-9335-00363.
- [588] E.C. Gryparis, M. Hatzia Apostolou, E. Papadimitriou, K. Avgoustakis, Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells, *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV.* 67 (2007) 1–8. doi:10.1016/j.ejpb.2006.12.017.
- [589] B. Romberg, W.E. Hennink, G. Storm, Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles, *Pharm. Res.* 25 (2008) 55–71. doi:10.1007/s11095-007-9348-7.
- [590] R.L. Hong, C.J. Huang, Y.L. Tseng, V.F. Pang, S.T. Chen, J.J. Liu, et al., Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: is surface coating with polyethylene glycol beneficial?, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5 (1999) 3645–3652.
- [591] T. Kaasgaard, O.G. Mouritsen, K. Jørgensen, Screening effect of PEG on avidin binding to liposome surface receptors, *Int. J. Pharm.* 214 (2001) 63–65.
- [592] H. Hatakeyama, H. Akita, K. Kogure, M. Oishi, Y. Nagasaki, Y. Kihira, et al., Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid, *Gene Ther.* 14 (2007) 68–77. doi:10.1038/sj.gt.3302843.
- [593] L.Y. Song, Q.F. Ahkong, Q. Rong, Z. Wang, S. Ansell, M.J. Hope, et al., Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1558 (2002) 1–13.
- [594] N. Sanders, C. Rudolph, K. Braeckmans, S.C. De Smedt, J. Demeester, Extracellular barriers in respiratory gene therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 115–127. doi:10.1016/j.addr.2008.09.011.
- [595] H. Schellekens, W.E. Hennink, V. Brinks, The immunogenicity of polyethylene glycol: facts and fiction, *Pharm. Res.* 30 (2013) 1729–1734. doi:10.1007/s11095-013-1067-7.
- [596] Y. Mima, Y. Hashimoto, T. Shimizu, H. Kiwada, T. Ishida, Anti-PEG IgM Is a Major Contributor to the Accelerated Blood Clearance of Polyethylene Glycol-Conjugated Protein, *Mol. Pharm.* 12 (2015) 2429–2435. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00144.
- [597] A.S. Abu Lila, K. Nawata, T. Shimizu, T. Ishida, H. Kiwada, Use of polyglycerol (PG), instead of polyethylene glycol (PEG), prevents induction of the accelerated blood clearance phenomenon against long-circulating liposomes upon repeated administration, *Int. J. Pharm.* 456 (2013) 235–242. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.059.
- [598] M. Morille, C. Passirani, A. Vonarbourg, A. Clavreul, J.-P. Benoit, Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer, *Biomaterials.* 29 (2008) 3477–3496. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.036.
- [599] S. Di Gioia, A. Trapani, S. Castellani, A. Carbone, G. Belgiovine, E.F. Craparo, et al., Nanocomplexes for gene therapy of respiratory diseases: Targeting and overcoming the mucus barrier, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 34 (2015) 8–24. doi:10.1016/j.pupt.2015.07.003.

Références Bibliographiques

- [600] Y. Liu, D. Liggitt, W. Zhong, G. Tu, K. Gaensler, R. Debs, Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 24864–24870.
- [601] N. Zhu, D. Liggitt, Y. Liu, R. Debs, Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice, *Science*. 261 (1993) 209–211.
- [602] A. Thierry, Y. Lunardi-Iskandar, J. Bryant, P. Rabinovich, R. Gallo, L. 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.
- [603] M. Belting, Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 145–151. doi:10.1016/S0968-0004(03)00031-8.
- [604] K.A. Mislick, J.D. Baldeschwieler, Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 12349–12354.
- [605] F. Liu, H. Qi, L. Huang, D. Liu, Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration, *Gene Ther.* 4 (1997) 517–523. doi:10.1038/sj.gt.3300424.
- [606] Y.K. Song, F. Liu, S. Chu, D. Liu, Characterization of Cationic Liposome-Mediated Gene Transfer *In Vivo* by Intravenous Administration, *Hum. Gene Ther.* 8 (1997) 1585–1594. doi:10.1089/hum.1997.8.13-1585.
- [607] R. Kircheis, S. Schüller, S. Brunner, M. Ogris, K.H. Heider, W. Zauner, et al., Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo, *J. Gene Med.* 1 (1999) 111–120. doi:10.1002/(SICI)1521-2254(199903/04)1:2<111::AID-JGM22>3.0.CO;2-Y.
- [608] P. Delépine, C. Guillaume, T. Montier, J.C. Clément, J.J. Yaouanc, H. Des Abbayes, et al., Biodistribution study of phosphonolipids: a class of non-viral vectors efficient in mice lung-directed gene transfer, *J. Gene Med.* 5 (2003) 600–608. doi:10.1002/jgm.385.
- [609] J. Mérian, R. Boisgard, P.-A. Bayle, M. Bardet, B. Tavitian, I. Texier, Comparative biodistribution in mice of cyanine dyes loaded in lipid nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV.* 93 (2015) 1–10. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.019.
- [610] T. Gjetting, N.S. Arildsen, C.L. Christensen, T.T. Poulsen, J.A. Roth, V.N. Handlos, et al., In vitro and in vivo effects of polyethylene glycol (PEG)-modified lipid in DOTAP/cholesterol-mediated gene transfection, *Int. J. Nanomedicine.* 5 (2010) 371–383.
- [611] H. Sakurai, F. Sakurai, K. Kawabata, T. Sasaki, N. Koizumi, H. Huang, et al., Comparison of gene expression efficiency and innate immune response induced by Ad vector and lipoplex, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 117 (2007) 430–437. doi:10.1016/j.jconrel.2006.11.030.
- [612] H. Sakurai, K. Kawabata, F. Sakurai, S. Nakagawa, H. Mizuguchi, Innate immune response induced by gene delivery vectors, *Int. J. Pharm.* 354 (2008) 9–15. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.06.012.
- [613] L. Alexopoulou, A.C. Holt, R. Medzhitov, R.A. Flavell, Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3, *Nature.* 413 (2001) 732–738. doi:10.1038/35099560.
- [614] F. Heil, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, et al., Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8, *Science.* 303 (2004) 1526–1529. doi:10.1126/science.1093620.
- [615] S. Uematsu, S. Akira, Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands, *Handb. Exp. Pharmacol.* (2008) 1–20. doi:10.1007/978-3-540-72167-3_1.
- [616] S. Li, S.P. Wu, M. Whitmore, E.J. Loeffert, L. Wang, S.C. Watkins, et al., Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipidic vectors, *Am. J. Physiol.* 276 (1999) L796–804.
- [617] M.F. Lindberg, N. Carmoy, T. Le Gall, A. Fraix, M. Berchel, C. Lorilleux, et al., The gene transfection properties of a lipophosphoramidate derivative with two phytanyl chains, *Biomaterials.* 33 (2012) 6240–6253. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.014.

Références Bibliographiques

- [618] S. Ferrari, D.M. Geddes, E.W.F.W. Alton, Barriers to and new approaches for gene therapy and gene delivery in cystic fibrosis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 1373–1393.
- [619] I. d' Angelo, C. Conte, M.I. La Rotonda, A. Miro, F. Quaglia, F. Ungaro, Improving the efficacy of inhaled drugs in cystic fibrosis: Challenges and emerging drug delivery strategies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 75 (2014) 92–111. doi:10.1016/j.addr.2014.05.008.
- [620] J.-S. Zhang, F. Liu, L. Huang, Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 689–698. doi:10.1016/j.addr.2004.12.004.
- [621] N.R. Labiris, M.B. Dolovich, Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56 (2003) 588–599.
- [622] J. Heyder, Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1 (2004) 315–320. doi:10.1513/pats.200409-046TA.
- [623] C. Darquenne, Aerosol Deposition in Health and Disease, *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 25 (2012) 140–147. doi:10.1089/jamp.2011.0916.
- [624] P.J. Anderson, J.D. Blanchard, J.D. Brain, H.A. Feldman, J.J. McNamara, J. Heyder, Effect of cystic fibrosis on inhaled aerosol boluses, *Am. Rev. Respir. Dis.* 140 (1989) 1317–1324. doi:10.1164/ajrccm/140.5.1317.
- [625] D.J. Thornton, J.K. Sheehan, From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1 (2004) 54–61. doi:10.1513/pats.2306016.
- [626] S. Di Gioia, A. Trapani, S. Castellani, A. Carbone, G. Belgiovine, E.F. Craparo, et al., Nanocomplexes for gene therapy of respiratory diseases: Targeting and overcoming the mucus barrier, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 34 (2015) 8–24. doi:10.1016/j.pupt.2015.07.003.
- [627] R.A. Cone, Barrier properties of mucus, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 75–85. doi:10.1016/j.addr.2008.09.008.
- [628] H.H. Sigurdsson, J. Kirch, C.-M. Lehr, Mucus as a barrier to lipophilic drugs, *Int. J. Pharm.* 453 (2013) 56–64. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.05.040.
- [629] J.A. Voynow, B.K. Rubin, Mucins, mucus, and sputum, *Chest.* 135 (2009) 505–512. doi:10.1378/chest.08-0412.
- [630] R.A. Cone, Barrier properties of mucus, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 75–85. doi:10.1016/j.addr.2008.09.008.
- [631] G. Lamblin, J.P. Aubert, J.M. Perini, A. Klein, N. Porchet, P. Degand, et al., Human respiratory mucins, *Eur. Respir. J.* 5 (1992) 247–256.
- [632] S.K. Lai, Y.-Y. Wang, D. Wirtz, J. Hanes, Micro- and macrorheology of mucus, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 86–100. doi:10.1016/j.addr.2008.09.012.
- [633] B.M. Ibrahim, M.D. Tsifansky, Y. Yang, Y. Yeo, Challenges and advances in the development of inhalable drug formulations for cystic fibrosis lung disease, *Expert Opin. Drug Deliv.* 8 (2011) 451–466. doi:10.1517/17425247.2011.561310.
- [634] S.K. Lai, Y.-Y. Wang, J. Hanes, Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 158–171. doi:10.1016/j.addr.2008.11.002.
- [635] R. Bansil, E. Stanley, J.T. LaMont, Mucin biophysics, *Annu. Rev. Physiol.* 57 (1995) 635–657. doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.003223.
- [636] M.O. Henke, A. Renner, R.M. Huber, M.C. Seeds, B.K. Rubin, MUC5AC and MUC5B Mucins Are Decreased in Cystic Fibrosis Airway Secretions, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31 (2004) 86–91. doi:10.1165/rcmb.2003-0345OC.
- [637] N.N. Sanders, E. Van Rompaey, S.C. De Smedt, J. Demeester, Structural alterations of gene complexes by cystic fibrosis sputum, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164 (2001) 486–493. doi:10.1164/ajrccm.164.3.2011041.
- [638] B.K. Rubin, Mucus, phlegm, and sputum in cystic fibrosis, *Respir. Care.* 54 (2009) 726–732; discussion 732.

Références Bibliographiques

- [639] N. Sanders, C. Rudolph, K. Braeckmans, S.C. De Smedt, J. Demeester, Extracellular barriers in respiratory gene therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 115–127. doi:10.1016/j.addr.2008.09.011.
- [640] B.M. Ibrahim, S. Park, B. Han, Y. Yeo, A strategy to deliver genes to cystic fibrosis lungs: a battle with environment, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 155 (2011) 289–295. doi:10.1016/j.jconrel.2011.07.039.
- [641] D. Cipolla, I. Gonda, H.-K. Chan, Liposomal formulations for inhalation, *Ther. Deliv.* 4 (2013) 1047–1072. doi:10.4155/tde.13.71.
- [642] H.H. Sigurdsson, J. Kirch, C.-M. Lehr, Mucus as a barrier to lipophilic drugs, *Int. J. Pharm.* 453 (2013) 56–64. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.05.040.
- [643] S.K. Lai, D.E. O’Hanlon, S. Harrold, S.T. Man, Y.-Y. Wang, R. Cone, et al., Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 1482–1487. doi:10.1073/pnas.0608611104.
- [644] J. Yu, Y.W. Chien, Pulmonary drug delivery: physiologic and mechanistic aspects, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14 (1997) 395–453.
- [645] D.B. Yeates, J.M. Sturgess, S.R. Kahn, H. Levison, N. Aspin, Mucociliary transport in trachea of patients with cystic fibrosis, *Arch. Dis. Child.* 51 (1976) 28–33.
- [646] R. Tarran, B.R. Grubb, J.T. Gatzky, C.W. Davis, R.C. Boucher, The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition, *J. Gen. Physiol.* 118 (2001) 223–236.
- [647] N. Hoiby, O. Ciofu, T. Bjarnsholt, *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis, *Future Microbiol.* 5 (2010) 1663–1674. doi:10.2217/fmb.10.125.
- [648] S. Moreau-Marquis, B.A. Stanton, G.A. O’Toole, *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 21 (2008) 595–599. doi:10.1016/j.pupt.2007.12.001.
- [649] M.T. Rybtke, P.Ø. Jensen, N. Høiby, M. Givskov, T. Tolker-Nielsen, T. Bjarnsholt, The implication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in infections, *Inflamm. Allergy Drug Targets.* 10 (2011) 141–157.
- [650] A.G. Oglesby-Sherrouse, L. Djapgne, A.T. Nguyen, A.I. Vasil, M.L. Vasil, The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*, *Pathog. Dis.* 70 (2014) 307–320. doi:10.1111/2049-632X.12132.
- [651] Y.D.N. Tremblay, S. Hathroubi, M. Jacques, [Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health], *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Vét.* 78 (2014) 110–116.
- [652] I. d’ Angelo, C. Conte, M.I. La Rotonda, A. Miro, F. Quaglia, F. Ungaro, Improving the efficacy of inhaled drugs in cystic fibrosis: Challenges and emerging drug delivery strategies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 75 (2014) 92–111. doi:10.1016/j.addr.2014.05.008.
- [653] B.S. Tseng, W. Zhang, J.J. Harrison, T.P. Quach, J.L. Song, J. Penterman, et al., The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin, *Environ. Microbiol.* 15 (2013) 2865–2878. doi:10.1111/1462-2920.12155.
- [654] A.-S. Messiaen, H. Nelis, T. Coenye, Investigating the role of matrix components in protection of *Burkholderia cepacia* complex biofilms against tobramycin, *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 13 (2014) 56–62. doi:10.1016/j.jcf.2013.07.004.
- [655] G. Sharma, S. Rao, A. Bansal, S. Dang, S. Gupta, R. Gabrani, *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets, *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.* 42 (2014) 1–7. doi:10.1016/j.biologicals.2013.11.001.
- [656] N. Ma, C. Ma, C. Li, T. Wang, Y. Tang, H. Wang, et al., Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13 (2013) 6485–6498.
- [657] T.S. Cohen, A. Prince, Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome, *Nat. Med.* 18 (2012) 509–519. doi:10.1038/nm.2715.
- [658] Q. Chu, J.D. Tousignant, S. Fang, C. Jiang, L.H. Chen, S.H. Cheng, et al., Binding and uptake of cationic lipid:pDNA complexes by polarized airway epithelial cells, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 25–36. doi:10.1089/10430349950019165.

Références Bibliographiques

- [659] J. Rejman, S. Di Gioia, A. Bragonzi, M. Conese, *Pseudomonas aeruginosa* infection destroys the barrier function of lung epithelium and enhances polyplex-mediated transfection, *Hum. Gene Ther.* 18 (2007) 642–652. doi:10.1089/hum.2006.192.
- [660] F. Kielgast, H. Schmidt, P. Braubach, V.E. Winkelmann, K.E. Thompson, M. Frick, et al., Glucocorticoids Regulate Tight Junction Permeability of Lung Epithelia by Modulating Claudin 8, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (2015). doi:10.1165/rcmb.2015-0071OC.
- [661] L.E. Donnelly, P.J. Barnes, Defective phagocytosis in airways disease, *Chest.* 141 (2012) 1055–1062. doi:10.1378/chest.11-2348.
- [662] A.K.A. Wright, S. Rao, S. Range, C. Eder, T.P.J. Hofer, M. Frankenberger, et al., Pivotal Advance: Expansion of small sputum macrophages in CF: failure to express MARCO and mannose receptors, *J. Leukoc. Biol.* 86 (2009) 479–489. doi:10.1189/jlb.1108699.
- [663] A.L. McCubbrey, J.L. Curtis, Efferocytosis and lung disease, *Chest.* 143 (2013) 1750–1757. doi:10.1378/chest.12-2413.
- [664] R.W. Vandivier, V.A. Fadok, C.A. Ogden, P.R. Hoffmann, J.D. Brain, F.J. Accurso, et al., Impaired clearance of apoptotic cells from cystic fibrosis airways, *Chest.* 121 (2002) 89S.
- [665] R.W. Vandivier, V.A. Fadok, P.R. Hoffmann, D.L. Bratton, C. Penvari, K.K. Brown, et al., Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 661–670. doi:10.1172/JCI13572.
- [666] A. Ediriwickrema, W.M. Saltzman, Nanotherapy for Cancer: Targeting and Multifunctionality in the Future of Cancer Therapies, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 1 (2015) 64–78. doi:10.1021/ab500084g.
- [667] G.J. Doherty, H.T. McMahon, Mechanisms of endocytosis, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 857–902. doi:10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.
- [668] P.V. Rewatkar, R.G. Parton, H.S. Parekh, M.-O. Parat, Are caveolae a cellular entry route for non-viral therapeutic delivery systems?, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 91 (2015) 92–108. doi:10.1016/j.addr.2015.01.003.
- [669] F. Mazzoni, H. Safa, S.C. Finnemann, Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture, *Exp. Eye Res.* 126 (2014) 51–60. doi:10.1016/j.exer.2014.01.010.
- [670] T.J. Chambers, The cellular basis of bone resorption, *Clin. Orthop.* (1980) 283–293.
- [671] J.A. WasylInka, M.M. Moore, Uptake of *Aspergillus fumigatus* Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein, *Infect. Immun.* 70 (2002) 3156–3163.
- [672] H. Matsui, L.G. Johnson, S.H. Randell, R.C. Boucher, Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 1117–1126.
- [673] R.P. Harbottle, R.G. Cooper, S.L. Hart, A. Ladhoff, T. McKay, A.M. Knight, et al., An RGD-oligolysine peptide: a prototype construct for integrin-mediated gene delivery, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998) 1037–1047. doi:10.1089/hum.1998.9.7-1037.
- [674] I.M. Kaplan, J.S. Wadia, S.F. Dowdy, Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 102 (2005) 247–253. doi:10.1016/j.jconrel.2004.10.018.
- [675] A.T. Jones, Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides, *J. Cell. Mol. Med.* 11 (2007) 670–684. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00062.x.
- [676] H. Noguchi, M. Matsushita, N. Kobayashi, M.F. Levy, S. Matsumoto, Recent advances in protein transduction technology, *Cell Transplant.* 19 (2010) 649–654. doi:10.3727/096368910X508744.
- [677] C. Gonçalves, E. Mennesson, R. Fuchs, J.-P. Gorvel, P. Midoux, C. Pichon, Macropinocytosis of polyplexes and recycling of plasmid via the clathrin-dependent pathway impair the transfection efficiency of human hepatocarcinoma cells, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 10 (2004) 373–385. doi:10.1016/j.ymthe.2004.05.023.

Références Bibliographiques

- [678] M.C. Kerr, R.D. Teasdale, Defining macropinocytosis, *Traffic Cph. Den.* 10 (2009) 364–371. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00878.x.
- [679] J. Gilleron, W. Querbes, A. Zeigerer, A. Borodovsky, G. Marsico, U. Schubert, et al., Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape, *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) 638–646. doi:10.1038/nbt.2612.
- [680] M.S. Robinson, Adaptable adaptors for coated vesicles, *Trends Cell Biol.* 14 (2004) 167–174. doi:10.1016/j.tcb.2004.02.002.
- [681] L.M. Traub, Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 583–596. doi:10.1038/nrm2751.
- [682] H.T. McMahon, E. Boucrot, Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011) 517–533. doi:10.1038/nrm3151.
- [683] L.M. Traub, Regarding the amazing choreography of clathrin coats, *PLoS Biol.* 9 (2011) e1001037. doi:10.1371/journal.pbio.1001037.
- [684] I. Mellman, R. Fuchs, A. Helenius, Acidification of the endocytic and exocytic pathways, *Annu. Rev. Biochem.* 55 (1986) 663–700. doi:10.1146/annurev.bi.55.070186.003311.
- [685] S. Xu, B.Z. Olenyuk, C.T. Okamoto, S.F. Hamm-Alvarez, Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: rationale and advances, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 121–138. doi:10.1016/j.addr.2012.09.041.
- [686] N.S. Chung, K.M. Wasan, Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1315–1334. doi:10.1016/j.addr.2003.12.003.
- [687] R.G. Parton, M.A. del Pozo, Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (2013) 98–112. doi:10.1038/nrm3512.
- [688] L. Pelkmans, M. Zerial, Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae, *Nature.* 436 (2005) 128–133. doi:10.1038/nature03866.
- [689] M.M. Hill, M. Bastiani, R. Luetterforst, M. Kirkham, A. Kirkham, S.J. Nixon, et al., PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function, *Cell.* 132 (2008) 113–124. doi:10.1016/j.cell.2007.11.042.
- [690] C.G. Hansen, N.A. Bright, G. Howard, B.J. Nichols, SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae, *Nat. Cell Biol.* 11 (2009) 807–814. doi:10.1038/ncb1887.
- [691] K.-A. McMahon, H. Zajicek, W.-P. Li, M.J. Peyton, J.D. Minna, V.J. Hernandez, et al., SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function, *EMBO J.* 28 (2009) 1001–1015. doi:10.1038/emboj.2009.46.
- [692] M. Bastiani, L. Liu, M.M. Hill, M.P. Jedrychowski, S.J. Nixon, H.P. Lo, et al., MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes, *J. Cell Biol.* 185 (2009) 1259–1273. doi:10.1083/jcb.200903053.
- [693] Z. Zhuang, V. Marshansky, S. Breton, D. Brown, Is caveolin involved in normal proximal tubule function? Presence in model PT systems but absence in situ, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 300 (2011) F199–206. doi:10.1152/ajprenal.00513.2010.
- [694] P. Scheiffele, P. Verkade, A.M. Fra, H. Virta, K. Simons, E. Ikonen, Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells, *J. Cell Biol.* 140 (1998) 795–806.
- [695] D. Lechardeur, G.L. Lukacs, Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous journey from the cytoplasm to the nucleus, *Hum. Gene Ther.* 17 (2006) 882–889. doi:10.1089/hum.2006.17.882.
- [696] H. Farhood, N. Serbina, L. Huang, The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer, *Biochim. Biophys. Acta.* 1235 (1995) 289–295.
- [697] null Wagner, Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 38 (1999) 279–289.
- [698] B. Demeneix, J.-P. Behr, Polyethylenimine (PEI), *Adv. Genet.* 53 (2005) 217–230.
- [699] Y. Xu, F.C. Szoka, Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection^{†, ‡}, *Biochemistry (Mosc.).* 35 (1996) 5616–5623. doi:10.1021/bi9602019.

Références Bibliographiques

- [700] L.K. Medina-Kauwe, J. Xie, S. Hamm-Alvarez, Intracellular trafficking of nonviral vectors, *Gene Ther.* 12 (2005) 1734–1751. doi:10.1038/sj.gt.3302592.
- [701] Z. Du, M.M. Munye, A.D. Tagalakis, M.D.I. Manunta, S.L. Hart, The Role of the Helper Lipid on the DNA Transfection Efficiency of Lipopolyplex Formulations, *Sci. Rep.* 4 (2014) 7107. doi:10.1038/srep07107.
- [702] A. Abe, A. Miyanohara, T. Friedmann, Enhanced gene transfer with fusogenic liposomes containing vesicular stomatitis virus G glycoprotein, *J. Virol.* 72 (1998) 6159–6163.
- [703] S. Futaki, Y. Masui, I. Nakase, Y. Sugiura, T. Nakamura, K. Kogure, et al., Unique features of a pH-sensitive fusogenic peptide that improves the transfection efficiency of cationic liposomes, *J. Gene Med.* 7 (2005) 1450–1458. doi:10.1002/jgm.796.
- [704] Y. Tu, J. Kim, A fusogenic segment of glycoprotein H from herpes simplex virus enhances transfection efficiency of cationic liposomes, *J. Gene Med.* 10 (2008) 646–654. doi:10.1002/jgm.1184.
- [705] M. Mével, N. Kamaly, S. Carmona, M.H. Oliver, M.R. Jorgensen, C. Crowther, et al., DODAG; a versatile new cationic lipid that mediates efficient delivery of pDNA and siRNA, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 143 (2010) 222–232. doi:10.1016/j.jconrel.2009.12.001.
- [706] C.-L. Chan, R.N. Majzoub, R.S. Shirazi, K.K. Ewert, Y.-J. Chen, K.S. Liang, et al., Endosomal escape and transfection efficiency of PEGylated cationic liposome-DNA complexes prepared with an acid-labile PEG-lipid, *Biomaterials.* 33 (2012) 4928–4935. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.03.038.
- [707] C.M. Wiethoff, C.R. Middaugh, Barriers to nonviral gene delivery, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 203–217. doi:10.1002/jps.10286.
- [708] D. Lechardeur, G.L. Lukacs, Intracellular barriers to non-viral gene transfer, *Curr. Gene Ther.* 2 (2002) 183–194.
- [709] E.M. Campbell, T.J. Hope, Role of the cytoskeleton in nuclear import, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 761–771.
- [710] P.L. Leopold, G. Kreitzer, N. Miyazawa, S. Rempel, K.K. Pfister, E. Rodriguez-Boulan, et al., Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis, *Hum. Gene Ther.* 11 (2000) 151–165. doi:10.1089/10430340050016238.
- [711] D. McDonald, M.A. Vodicka, G. Lucero, T.M. Svitkina, G.G. Borisy, M. Emerman, et al., Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells, *J. Cell Biol.* 159 (2002) 441–452. doi:10.1083/jcb.200203150.
- [712] null Pouton, null Seymour, Key issues in non-viral gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 34 (1998) 3–19.
- [713] J. Suh, D. Wirtz, J. Hanes, Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 3878–3882. doi:10.1073/pnas.0636277100.
- [714] C. Rosazza, J.-M. Escoffre, A. Zumbusch, M.-P. Rols, The actin cytoskeleton has an active role in the electrotransfer of plasmid DNA in mammalian cells, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 19 (2011) 913–921. doi:10.1038/mt.2010.303.
- [715] D. Pozzi, C. Marchini, F. Cardarelli, F. Salomone, S. Coppola, M. Montani, et al., Mechanistic evaluation of the transfection barriers involved in lipid-mediated gene delivery: interplay between nanostructure and composition, *Biochim. Biophys. Acta.* 1838 (2014) 957–967. doi:10.1016/j.bbamem.2013.11.014.
- [716] Lechardeur D, K-J Sohn, M Haardt, PB Joshi, M Monck, RW Graham, et al., Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer, *Gene Therapy.* 6 (1999) 482–497.
- [717] J. Zabner, A.J. Fasbender, T. Moninger, K.A. Poellinger, M.J. Welsh, Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 18997–19007.
- [718] D. Görlich, I.W. Mattaj, Nucleocytoplasmic transport, *Science.* 271 (1996) 1513–1518.
- [719] I. Mortimer, P. Tam, I. MacLachlan, R.W. Graham, E.G. Saravolac, P.B. Joshi, Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity, *Gene Ther.* 6 (1999) 403–411. doi:10.1038/sj.gt.3300837.

Références Bibliographiques

- [720] W.C. Tseng, F.R. Haselton, T.D. Giorgio, Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1445 (1999) 53–64.
- [721] E. Hébert, Improvement of exogenous DNA nuclear importation by nuclear localization signal-bearing vectors: a promising way for non-viral gene therapy?, *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 95 (2003) 59–68.
- [722] R.N. Cohen, M.A.E.M. van der Aa, N. Macaraeg, A.P. Lee, F.C. Szoka, Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 135 (2009) 166–174. doi:10.1016/j.jconrel.2008.12.016.
- [723] G.L. Lukacs, P. Haggie, O. Seksek, D. Lechardeur, N. Freedman, A.S. Verkman, Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 1625–1629.
- [724] Y. Choi, Y.-H. Jeon, J.-H. Kang, J.-K. Chung, M. Schmidt, A.C.-W. Kim, MIDGE/hNIS vaccination generates antigen-associated CD8+IFN-gamma+ T cells and enhances protective antitumor immunity, *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.* 120 (2007) 1942–1950. doi:10.1002/ijc.22567.
- [725] D.A. Dean, Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific, *Exp. Cell Res.* 230 (1997) 293–302. doi:10.1006/excr.1996.3427.
- [726] A.M. Miller, F.M. Munkonge, E.W.F.W. Alton, D.A. Dean, Identification of protein cofactors necessary for sequence-specific plasmid DNA nuclear import, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17 (2009) 1897–1903. doi:10.1038/mt.2009.127.
- [727] D.A. Dean, Cell-Specific Targeting Strategies for Electroporation-Mediated Gene Delivery in Cells and Animals, *J. Membr. Biol.* 246 (2013) 737–744. doi:10.1007/s00232-013-9534-y.
- [728] D.A. Dean, B.S. Dean, S. Muller, L.C. Smith, Sequence requirements for plasmid nuclear import, *Exp. Cell Res.* 253 (1999) 713–722. doi:10.1006/excr.1999.4716.
- [729] P. Blomberg, M. Eskandarpour, S. Xia, C. Sylvén, K.B. Islam, Electroporation in combination with a plasmid vector containing SV40 enhancer elements results in increased and persistent gene expression in mouse muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298 (2002) 505–510.
- [730] C.B. Sacramento, J.Z. Moraes, P.M.A. Denapolis, S.W. Han, Gene expression promoted by the SV40 DNA targeting sequence and the hypoxia-responsive element under normoxia and hypoxia, *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica Al.* 43 (2010) 722–727.
- [731] J.L. Young, J.N. Benoit, D.A. Dean, Effect of a DNA nuclear targeting sequence on gene transfer and expression of plasmids in the intact vasculature, *Gene Ther.* 10 (2003) 1465–1470. doi:10.1038/sj.gt.3302021.
- [732] J.L. Young, W.E. Zimmer, D.A. Dean, Smooth muscle-specific gene delivery in the vasculature based on restriction of DNA nuclear import, *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ. 233 (2008) 840–848. doi:10.3181/0712-RM-331.
- [733] A.P. Lam, D.A. Dean, Progress and prospects: nuclear import of nonviral vectors, *Gene Ther.* 17 (2010) 439–447. doi:10.1038/gt.2010.31.
- [734] G. Breuzard, M. Tertilt, C. Gonçalves, H. Cheradame, P. Géguan, C. Pichon, et al., Nuclear delivery of NFkappaB-assisted DNA/polymer complexes: plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) e71. doi:10.1093/nar/gkn287.
- [735] D.R. Gill, I.A. Pringle, S.C. Hyde, Progress and prospects: the design and production of plasmid vectors, *Gene Ther.* 16 (2009) 165–171. doi:10.1038/gt.2008.183.
- [736] A.R. Brooks, R.N. Harkins, P. Wang, H.S. Qian, P. Liu, G.M. Rubanyi, Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle, *J. Gene Med.* 6 (2004) 395–404. doi:10.1002/jgm.516.
- [737] O. Argyros, S.P. Wong, M. Niceta, S.N. Waddington, S.J. Howe, C. Coutelle, et al., Persistent episomal transgene expression in liver following delivery of a scaffold/matrix attachment region containing non-viral vector, *Gene Ther.* 15 (2008) 1593–1605. doi:10.1038/gt.2008.113.

Références Bibliographiques

- [738] Y. Tan, S. Li, B.R. Pitt, L. Huang, The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression *in vivo*, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 2153–2161. doi:10.1089/10430349950017149.
- [739] B.L. Hodges, K.M. Taylor, M.F. Joseph, S.A. Bourgeois, R.K. Scheule, Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 10 (2004) 269–278. doi:10.1016/j.ymthe.2004.04.018.
- [740] K. Kako, M. Nishikawa, H. Yoshida, Y. Takakura, Effects of inflammatory response on *in vivo* transgene expression by plasmid DNA in mice, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 3074–3083. doi:10.1002/jps.21254.
- [741] M. Mitsui, M. Nishikawa, L. Zang, M. Ando, K. Hattori, Y. Takahashi, et al., Effect of the content of unmethylated CpG dinucleotides in plasmid DNA on the sustainability of transgene expression, *J. Gene Med.* 11 (2009) 435–443. doi:10.1002/jgm.1317.
- [742] D.R. Gill, R.P. Bazzani, S.C. Hyde, Strategies for long-term expression of transgenes in the respiratory epithelium, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12 (2010) 386–393.
- [743] V.C.F. Mosqueira, P. Legrand, A. Gulik, O. Bourdon, R. Gref, D. Labarre, et al., Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules, *Biomaterials.* 22 (2001) 2967–2979. doi:10.1016/S0142-9612(01)00043-6.
- [744] S. Batzri, E.D. Korn, Single bilayer liposomes prepared without sonication, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 298 (1973) 1015–1019. doi:10.1016/0005-2736(73)90408-2.
- [745] A. Hem, A.J. Smith, P. Solberg, Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guineapig, ferret and mink, *Lab. Anim.* 32 (1998) 364–368. doi:10.1258/002367798780599866.
- [746] A. Fraix, T. Montier, N. Carmoy, D. Loizeau, L. Burel-Deschamps, T. Le Gall, et al., Cationic lipothiophosphoramidates for gene delivery: synthesis, physico-chemical characterization and gene transfection activity--comparison with lipo-phosphoramidates, *Org. Biomol. Chem.* 9 (2011) 2422–2432. doi:10.1039/c0ob00981d.
- [747] A. Fraix, T. Montier, T. Le Gall, C.M. Sevrain, N. Carmoy, M.F. Lindberg, et al., Lipothiophosphoramidates for gene delivery: critical role of the cationic polar headgroup, *Org. Biomol. Chem.* 10 (2012) 2051–2058. doi:10.1039/c2ob06812e.
- [748] M. Bikram, M. Lee, C.-W. Chang, M.-M. Janát-Amsbury, S.E. Kern, S.W. Kim, Long-circulating DNA-complexed biodegradable multiblock copolymers for gene delivery: degradation profiles and evidence of dysopsonization, *J. Controlled Release.* 103 (2005) 221–233. doi:10.1016/j.jconrel.2004.11.011.
- [749] G. Osaka, K. Carey, A. Cuthbertson, P. Godowski, T. Patapoff, A. Ryan, et al., Pharmacokinetics, tissue distribution, and expression efficiency of plasmid [33P]DNA following intravenous administration of DNA/Cationic lipid complexes in mice: Use of a novel radionuclide approach, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 612–618. doi:10.1021/js9504494.
- [750] E.W.F.W. Alton, D.K. Armstrong, D. Ashby, K.J. Bayfield, D. Bilton, E.V. Bloomfield, et al., Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial, *Lancet Respir. Med.* (2015). doi:10.1016/S2213-2600(15)00245-3.

Résumé

La mucoviscidose est une maladie monogénique, caractérisée par des mutations survenant au niveau du gène CFTR (Cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Le clonage en 1989 du gène CFTR a permis d'envisager de traiter cette maladie par thérapie génique. Cela consiste à transférer à l'aide d'un vecteur, une version normale du gène CFTR dans les cellules atteintes des patients. En raison de la gravité des complications pulmonaires, c'est l'épithélium respiratoire qui constitue aujourd'hui le tissu cible pour le transfert de gènes. Le principe de la thérapie génique est évidemment très séduisant et un certain nombre d'essais cliniques ont d'ores et déjà été réalisés. La thérapie génique nécessite des outils de vectorisation efficaces et compatibles avec une utilisation répétée en clinique.

Mon sujet de thèse a porté donc sur le développement, la biodistribution et l'optimisation de vecteurs synthétiques (lipides cationiques) pour le transfert de gènes dans l'épithélium respiratoire. Au cours de mes travaux, nous avons donc pu mettre au point des lipophosphoramidates KLN47 fluorescents utiles pour les études de biodistribution *in vivo*. Comparés au KLN47 non fluorescents, ces nouveaux composés présentent les mêmes propriétés physicochimiques, à savoir une taille relativement petite et un potentiel zêta positif. Sur lignées cellulaires, nous avons montré que les nouvelles formulations étaient aussi efficaces que le KLN47, et pas ou peu toxiques. Ensuite, sur modèle animal, les profils de biodistribution de lipoplexes pégylés et non-pégylés ont été comparés après injection systémique. Les profils de biodistribution des lipoplexes pégylés et non-pégylés étaient similaires, cependant, la pégylation des complexes a conduit à une circulation prolongée dans la circulation sanguine, alors que l'expression du transgène (luciférase) était équivalente dans les deux cas. De plus, l'activité luciférase était similaire à celle obtenue avec le KLN47 non fluorescent. Nous avons ainsi démontré que l'ajout des sondes lipidiques fluorescentes dans la solution liposomale du KLN47, ne modifie pas ses propriétés physicochimiques et transfectantes. L'ensemble des résultats montre que nous disposons d'outils prometteurs pour les études de biodistribution *in vivo*. D'autres molécules ont également été testées avec succès.

Abstract

Cystic fibrosis is a monogenic disease characterized by mutations occurring at the CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gene. The cloning in 1989 of the CFTR gene has enabled to consider treating this disease by gene therapy. This consists of transferring a normal version of the CFTR gene in the affected patients' cells, using a vector. Due to the severity of pulmonary complications, it is obvious that the respiratory epithelium constitutes the target tissue for the gene transfer. The principle of gene therapy is indeed very attractive and a number of clinical trials have already been made. Gene therapy requires vectorization tools that are efficient and compatible with repeated clinical use.

My thesis has focused on the development, biodistribution and optimization of synthetic vectors (cationic lipids) for gene transfer in the respiratory epithelium. During my work, we were able to develop useful fluorescent KLN47 lipophosphoramidates for *in vivo* biodistribution studies. Compared to non fluorescent KLN47, these new compounds exhibit the same physicochemical properties: a relatively small size and a positive zeta potential. On cell lines, we found that the new formulations were as effective as the KLN47, with little or no toxicity. Then, in animal models, the biodistribution profiles of pegylated and non-pegylated lipoplexes were compared after systemic injection. The biodistribution profiles of pegylated and non-pegylated lipoplexes were similar. However, the pegylation of the complex resulted in prolonged circulation in the bloodstream, whereas transgene expression (luciferase) was equivalent in both cases. In addition, luciferase activity was similar to that obtained with the non-fluorescent KLN47. We have demonstrated that the addition of fluorescent lipid probes in the liposomal solution KLN47, does not change its physicochemical and transfectant properties. The overall results show that we have promising tools for *in vivo* biodistribution studies. Other molecules have also been tested successfully.