



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

Mattias Lindberg

► **To cite this version:**

Mattias Lindberg. 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, 2012. Français. NNT : 2012BRES0101 . tel-03770250

HAL Id: tel-03770250

<https://theses.hal.science/tel-03770250>

Submitted on 6 Sep 2022

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

Mattias LINDBERG

Préparée à l'INSERM UMR 1078

dans l'équipe "Thérapie génique et cellulaire"

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 28 novembre 2012

devant le jury composé de :

Véronique CATROS

Professeur, Université de Rennes 1 / *Examinatrice*

Pierre LEHN

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

Paul-Alain JAFFRES

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Invité*

Pascal LOYER

Chargé de recherche, INSERM UMR 991 Rennes / *Rapporteur*

Patrick MIDOUX

Directeur de recherche, CNRS UPR 4301 Orléans / *Rapporteur*

Tristan MONTIER

MCU, Université de Bretagne Occidentale / *Co-directeur de thèse*

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité INSERM UMR1078, à l'Université de Bretagne Occidentale, et a été financé par la Région Bretagne que je remercie.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Claude Férec pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour les échanges authentiques que nous avons eus au cours de ces trois années.

Je remercie ensuite Monsieur le Docteur Patrick Midoux et Monsieur le Docteur Pascal Loyer de me faire l'honneur de juger ce travail, ainsi que Madame le Professeur Véronique Catros qui a accepté de participer à mon jury.

Monsieur le Docteur Tristan Montier est à l'origine de ce travail de thèse. Il m'a accueilli au sein de l'équipe Thérapie Génique et Cellulaire et encadré lors de mon Master 2, puis de ma thèse. Je désire lui témoigner toute ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a accordée et l'aide qu'il m'a fournie durant ce temps. Son écoute, ses conseils et encouragements m'ont été d'une aide très précieuse.

Monsieur le Professeur Pierre Lehn, mon directeur de thèse, est à l'origine d'une grande partie de ces travaux, qui ne représentent qu'une infime bricole de tout ce qu'il a accompli dans le domaine du transfert de gènes et de la mucoviscidose au cours de sa longue et vaste carrière. Il m'a beaucoup apporté au cours de cette thèse, aussi bien d'un point de vue humain que scientifique. Je tiens à lui adresser ici mon plus profond respect et ma plus grande sympathie. Je ne peux pas espérer que ce travail soit à la hauteur de ses espérances, alors je vais simplement croiser les doigts pour que ce ne soit pas trop « nul à chier » à son goût.

Lors de mon arrivée au laboratoire, j'ai également été accueilli par Nathalie Carmoy (devenue Jezequel par la suite) et Tony Le Gall. Au-delà de toute l'expérience qu'ils m'ont faite partager et toute l'aide qu'ils m'ont fournie durant ma thèse, j'ai eu la chance de partager avec chacun des instants privilégiés qui resteront gravés dans ma mémoire. Je souhaite également associer Caroline Denis et Yann Sibiril à ces remerciements, ainsi que Véronique Laurent, qui a pris de son temps lorsque je n'en avais plus. Merci à tous infiniment pour votre amitié, votre aide, votre soutien et vos encouragements. Sans vous, cette thèse n'aurait pas eu la même saveur.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Paul-Alain Jaffrès et toute son équipe « Phosphore et Vectorisation » pour tous les échanges que nous avons eus durant ces trois années. Je remercie ainsi Mathieu Berchel, Aurore Fraix, Jean-Pierre Healters et Hélène Couthon-Gourvès, Christophe Lorilleux, et Charlotte Sevrain. Chacun de vous m'a beaucoup appris de son domaine.

Je remercie également Monsieur le Docteur Alain Fautrel et toute son équipe de la plateforme H²P² de Rennes pour les analyses histologiques des tissus de mes précieuses souris.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Steven Hyde et Madame le Professeur Deborah Gill du *Gene Medicine Group* à Oxford de nous avoir fourni le plasmide pGM144, ainsi que les membres de leur équipe pour les différentes analyses effectuées.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Docteur Michael Reber qui m'a encadré au début de mon cursus universitaire. De par tout ce qu'il m'a transmis, scientifiquement et humainement, il a été à la source de mon orientation vers le monde de la Recherche.

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'unité INSERM U1078 que j'ai pu côtoyer de près ou de loin au cours de mon cursus. Je pense tout d'abord à Marc Blondel, Cécile Voisset et Gaëlle Friocourt-Masse avec qui j'ai eu de nombreuses riches et sympathiques discussions. Je remercie aussi très chaleureusement Pascal Delépine, Olivier Mignen, Laurent et Catherine Corcos, Sophie le Hir, Lucie Kemmat, Nathalie Benz, Rozenn Joubrel et Chantal Baclet.

Je remercie également Mathieu Mével et Benoit Chatin de l'Institut du Thorax à Nantes, avec qui j'ai eu la chance de beaucoup échanger aux cours de nos entrevues aux quatre coins de la France.

Merci à toutes les personnes du « laboratoire de neurobiologie cutanée », particulièrement Nicolas Lebonvallet, Jérémy Chéret, Candice La Croix et Christelle Le Gall pour cette cohabitation particulièrement amicale.

Je remercie aussi un grand nombre de personnes du LATIM, et particulièrement Thomas Wentz, Julien Leboucher et Micheline Rouillard pour leur amitié et leur soutien.

Je remercie également Adeline Kerviel que j'ai épaulée lors de son passage au laboratoire. Une très belle rencontre... Je te souhaite le meilleur !

Maintenant arrivent tous les copains qui, de près ou de loin, ont cru en mes capacités (... ou du moins en ma motivation !) : Rachel, Féfé, Yann, Méhdi, Maxou, Martin, sans oublier la petite Clairette. Mais également Romain, Mareck, Anne-So, Eric, tout le club de ping' de Guipavas, Oliv' & Balou, Gaëlle, Portos, Marie, la coloc' de Ker-Ischia, et bien d'autres... Vous êtes tous indirectement liés à l'aboutissement de ce travail. Merci.

Enfin, je tiens à remercier, du plus profond de mon cœur, toute ma famille. Tout d'abord mes deux grands frères Olivier et Nils, ainsi que mes belles-sœurs Céline et Lo qui m'ont donné une si jolie marmaille. Nana, Elise, Jojo, Juliette et Gus', j'écris ici vos noms au cas où l'un d'entre vous s'intéresse un jour à la Science et ouvre ce document. Malgré la distance, sachez à quel point chacune de vos naissances a été importante dans ma vie, et que votre simple existence me remplit de bonheur. J'ai également une profonde pensée pour Mamie et Tante France qui ne sont plus là. Pour finir, je remercie mes parents, Chantal et Folke Lindberg, qui m'ont donné la vie. Merci pour votre amour, votre tendresse et votre soutien sans faille. Je suis extrêmement fier d'être votre enfant... Ce travail vous est dédié.

Et puis toi, Laurène. Tu as su m'accompagner pendant la rédaction de ce manuscrit avec la précision et la justesse qui te caractérisent. Merci d'être entrée dans ma vie...

*Il n'y a pas de bonheur sans douleur, pas de mérite sans labeur
et pas de réussite sans erreur.*

Massimo Castronovo, *Le bonheur*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
Du concept de « thérapie génique » aux réalités cliniques	4
Chapitre I : LA MUCOVISCIDOSE	10
I Historique et généralités	10
II Le gène <i>CFTR</i> et ses mutations	11
1. Le gène <i>CFTR</i>	11
2. Les différentes classes de mutations du gène <i>CFTR</i>	12
III La protéine <i>CFTR</i> sauvage	15
1. Structure de la protéine <i>CFTR</i>	15
2. Fonctions de la protéine <i>CFTR</i>	19
IV Physiopathologie et principales manifestations cliniques de la mucoviscidose	21
1. Manifestations pulmonaires	22
2. Manifestations intestinales	22
3. Manifestations pancréatiques	22
4. Manifestations hépatobiliaires	23
5. Manifestations génitales	23
6. Autres manifestations	23
V Diagnostic et dépistage néonatal	24
1. Diagnostic	24
2. Dépistage	24
a) Dépistage néonatal	24
b) Dépistage prénatal	24
VI Prise en charge et traitements symptomatiques	25
VII Nouvelles thérapies	28
1. Thérapie de la protéine	28
2. Thérapie génique : considérations physiologiques	30
a) Structure et fonctions de l'appareil respiratoire	30
b) Composition de l'épithélium des voies respiratoires	33
c) Cellules cibles de la thérapie génique et niveaux d'expression de <i>CFTR</i>	35
Chapitre II : LA THERAPIE GENIQUE	37
I Problématique de la thérapie génique somatique ou germinale	37
II Stratégies et approches de thérapie génique	38
III La thérapie génique actuelle en quelques chiffres	45
1. Les catégories de maladies visées	45
2. Les techniques utilisées dans les essais cliniques	46
IV Les techniques de transfert de gènes	47
1. Les vecteurs viraux	47
a) Les rétrovirus	48
b) Les adénovirus	50
c) Les virus adéno-associés	51
d) Autres virus	55
e) Conclusion sur les vecteurs viraux	56

2.	Les méthodes physiques	56
a)	L'ADN nu	57
b)	Le canon à ADN	57
c)	La <i>jet injection</i>	58
d)	La sonoporation	58
e)	L'électroporation	59
f)	La magnétofection	59
3.	Les vecteurs synthétiques	60
a)	Généralités sur les vecteurs cationiques	61
b)	Les polymères cationiques	62
(1)	Les dérivés de la poly-L-lysine	62
(2)	Les dérivés de la polyéthylèneimine	64
(3)	Les dendrimères	66
(4)	Le chitosan	67
c)	Les lipides cationiques	68
(1)	Lipides monocationiques	69
(2)	Lipides polycationiques	71
(3)	Lipides cationiques dérivés du cholestérol	72
(4)	Importance des trois domaines structuraux des lipides cationiques	73
(a)	<i>Partie hydrophobe</i>	73
(b)	<i>Groupe espaceur</i>	74
(c)	<i>Tête polaire</i>	74
(5)	Quelques notions concernant la dynamique des lipides cationiques en solution	76
(a)	<i>Transition de phase</i>	77
(b)	<i>Organisation supramoléculaire des liposomes et lipoplexes</i>	77
(c)	<i>Organisation macroscopique des lipoplexes</i>	80
V	Etapas et mécanismes de transfection par les vecteurs synthétiques	82
1.	Barrières extracellulaires et intracellulaires	82
a)	Trafic extracellulaire	83
(1)	Barrières liées à une délivrance par les voies aériennes	83
(2)	Barrières liées à une délivrance par la voie systémique	84
(a)	<i>Biodistribution</i>	84
(b)	<i>Interactions avec les constituants sanguins</i>	87
b)	Le ciblage cellulaire	89
c)	Trafic intracellulaire	90
(1)	L'entrée dans la cellule : les voies d'endocytose	90
(2)	La sortie de l'endosome	92
(a)	<i>Cas des polyplexes</i>	93
(b)	<i>Cas des lipoplexes</i>	94
d)	Le routage intracellulaire du plasmide et l'entrée dans le noyau	95
e)	L'expression du transgène	98
2.	Réponses immunitaires et inflammatoires face aux systèmes de transfert de gènes non viraux	102
VI	Evolution des lipides cationiques développés au laboratoire	104

MATERIELS & METHODES	109
1. Plasmides	109
2. Lipides cationiques utilisés et formulation	110
3. Préparation des lipoplexes et détermination du rapport de charges	113
4. Test de complexation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	114
5. Transfection <i>in vitro</i>	115
a) Lignées cellulaires et conditions de culture	115
b) Protocole de transfection <i>in vitro</i>	115
c) Détermination de la cytotoxicité	116
d) Révélation de l'expression du gène rapporteur <i>luc</i>	116
(1) Lyse cellulaire	117
(2) Dosage protéique	117
(3) Dosage de l'activité luciférase	117
6. Protocole de transfection <i>in vivo</i>	118
a) Modes d'administration des lipoplexes	119
b) Quantification de l'expression du transgène	120
(1) Imagerie de bioluminescence <i>in vivo</i>	120
(2) Quantification de l'expression du transgène dans les organes isolés	120
c) Analyse de l'atteinte hépatique et de la réaction inflammatoire	122
(1) Prélèvement de sang et isolement du plasma	122
(2) Dosage des transaminases hépatiques	122
d) Evaluation de l'impact inflammatoire et immunogène	123
e) Analyses histologiques	124
(1) Analyse anatomo-pathologique des foies de souris traitées	124
(2) Identification des cellules transfectées	124
I. Les propriétés de transfection d'un lipophosphoramidate portant deux chaînes phytanyles	125
II. L'utilisation du plasmide pGM144 combiné au lipophosphoramidate BSV4 permet une expression du transgène durable et des réadministrations efficaces, sans induire d'effets secondaires chroniques	140
III. Les lipothiophosphoramidates pour le transfert de gènes : rôle crucial de la tête polaire cationique	164
IV. Evaluation d'une sélection de lipothiophosphoramidates ainsi que du lipophosphoramidate KLN47 pour le transfert de gènes à destination du poumon <i>in vivo</i>	173
<u>DISCUSSION, CONCLUSIONS et PERSPECTIVES GENERALES</u>	<u>191</u>
Références bibliographiques	200
Annexe : Lipothiophosphoramidates for gene delivery: critical role of the cationic polar headgroup (Electronic Supplementary Materials)	228
Publications et communications	256

TABLE DES ABREVIATIONS

- A -

AAV : Adeno-associated virus
ABC : ATP binding cassette
ABC (phenomenon) : Accelerated blood clearance (phenomenon)
ATP : Adénosine triphosphate
ADN (ou **DNA**) : Acide désoxyribonucléique
ADNc (ou **cDNA**) : ADN complémentaire
ADNp (ou **pDNA**) : ADN plasmidique
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien
ALD : Adrénoleucodystrophie
ALT (ou **ALAT**) : Alanine aminotransférase
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AN : Acides nucléiques
ApoE : Apolipoprotéine E
ARN (ou **RNA**) : Acide ribonucléique
ARNi (ou **RNAi**) : ARN interférence ou ARN interférent
ARNm (ou **mRNA**) : ARN messager
AST (ou **ASAT**) : Aspartate aminotransférase
ASGPR : Récepteur aux asialoglycoprotéines
ATP : Adénosine triphosphate

- B -

BB : Bacterial backbone
BET : Bromure d'éthidium
BGH : Bovine growth hormone
BGTC : Bis(guanidinium)-tren-cholestérol
BMD : Becker's muscular dystrophy (dystrophie musculaire de Becker)
BSV : Brest synthetic vector

- C -

CAR : Coxsackie and adenovirus receptor
CE : Cassette d'expression
CF : Cystic Fibrosis (Mucoviscidose)
CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CGT : Chronic granulomatous disease (granulomatose septique chronique)
Chol : Cholestérol
CMV : Cytomégalovirus
CpG : Cytosine phosphate guanine
CR : Charge ratio

- D -

Da : Dalton
DAB : Diaminobenzidine
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DC-Chol : [3- β -N-(N', N'diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol
DDA : Degré de désacétylation
DDP : Différence de potentiel
DEAE : Diéthylaminoéthyl
DICS-ADA : Déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine désaminase
DICS-X : Déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X
DLS : Dynamic light scattering
DMD : Duchenne muscular dystrophy (dystrophie musculaire de Duchenne)
DOGS : Dioctadécylamine-glycine-spermine
DOPC : Dioléoyl phosphatidyl choline
DOPE : dioléoyl-phosphatidyléthanolamine
DOSPA : 2,3-dioléoxy-N-[2(sperminecarboxamido)éthyl]N,N-diméthyl 1-propananium trifluoroacétate
DOTAP : Méthylsulfate de N-[1-(2,3 dioléoxyloxy)propyl](N,N,N-triméthylammonium)
DOTMA : Chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium
DTBP : Diméthyl-3,3'-dithiobispropionimide
DTS : DNA nuclear targeting sequence

- E -

E. coli : *Escherichia coli*
EF1 α : Elongation factor-1 α
EPR : Enhanced permeability and retention

- F -

FEV1 : Volume maximal expiré en 1 seconde
FT : Facteur de transcription
FRET : Fluorescence resonance energy transfer

- G -

GL62 : N1-spermine cholesterylcarbamate
GL67 : N4-spermine cholesterylcarbamate
GTA : Gene transfer agent
GTP : Guanosine triphosphate
GUV : Giant unilamellar vesicle

- H -

h : Heure
H_I : Phase hexagonale normale
H_{II}^c : Phase hexagonale inverse
HDAdV : Helper-dependent adenoviral vector
HDL : High density lipoprotein
HER2 : Human epidermal growth factor receptor-2

HPLC : High performance liquid chromatography
HRP : HorseRadish Peroxydase
HSV : Herpes simplex virus
HSV-TK : HSV-thymidine kinase
ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule 1
IEP : Immediate early promoter
IFN: Interféron

- I -

IEP : Immediate early promoter
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
ITR : Inverted terminal repeat

- K -

kb : Kilobase

- L -

LC α : Phase lamellaire
LDL : Low density lipoprotein
LFM : Lipofectamine
LPL : Lipoprotein lipase
LSA : Liquide de surface des voies aériennes
LTR : Long terminal repeat
LUV : Large unilamellar vesicle

- M -

MDX : Muscular dystrophy X-linked
miRNA : MicroRNA
MLV : Multilamellar vesicles
MPEG2000-DSPE : 1,2-Distearoyl-phosphatidylethanolamine-methyl-polyethyleneglycol-2000
MSD : Membrane spanning domain

- N -

NBD : Nucleotide binding domain
NF- κ B: Nuclear factor-kappa B
NPC: Nuclear pore complex
NLS : Nuclear localization signals

- O -

ODN : Oligodeoxynucleotide
ON : Oligonucléotide
ORCC : Outwardly rectifying chloride channel
ORL : Oto-rhino-laryngologie

- P -

PAMAM : polyamindodendrimères
pb : Paire de bases
PC : Phosphatidylcholine
PCR : Polymerase chain reaction
PEG : Polyéthylène glycol
PEI : Polyéthylèneimine

PHPMA : Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]
PTC : Premature termination codon

- Q -

qPCR : Quantitative PCR

- R -

RD : Regulatory domain
RE : Réticulum endoplasmique
rhDNAs : Recombinant human deoxyribonuclease
RISC : RNA-Induced Silencing Complex
RLU : Relative light unit
RMN (ou NMR) : Résonance magnétique nucléaire
ROMK : Renal outer medullary potassium channel
RT-PCR : Reverse transcription PCR

- S -

S/MAR : Scaffold/matrix attachment region
SAXS : Small-angle x-ray scattering
SB : Sleeping Beauty
SET (ou exon skipping) : Saut d'exons thérapeutique
shRNA : Small hairpin RNA
SIN : Self-inactivating
siRNA : Small interfering RNA
sn : Small nuclear
SIV : Simian immunodeficiency virus
snRNA: Small nuclear RNA
SOID : Syndrome d'occlusion intestinale distale
SMaRT : Spliceosome-mediated RNA trans-splicing
SPM : Système des phagocytes mononucléés
SUV : Small unilamellar vesicle
SV40 : Simian virus 40

- T -

TALEN : Transcription activator-like effector nuclease
TCR : T cell receptor
TIR : Trypsine immunoréactive
TLR : Toll-like receptor
Tm : Température de transition de phase
TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha
TRITC : Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate

- U -

UTP : Uridine triphosphate

- V -

V-ATPase : Vacuolar-type H⁺-ATPase
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor
VEMS : Volume expiratoire maximum par seconde
VIH (ou HIV) : Virus de l'immunodéficience humaine

- Z -

ZFN : Zinc-finger nuclease

INTRODUCTION

Depuis 1944, date à laquelle Avery, McLeod et McCarthy mirent en évidence que l'ADN était le support de l'information génétique^[1], découverte suivie de près par la publication de sa structure par Watson et Crick^[2], la génétique moléculaire a connu plus d'un demi-siècle d'avancées spectaculaires.

En 1963, Lederberg présentait déjà la portée de ces découvertes : « *Nous devrions anticiper les manipulations telles que la culture de cellules germinales in vitro, ainsi que les manipulations telles que l'échange de chromosomes et de segments. L'application ultime de la biologie moléculaire pourrait être le contrôle direct des séquences d'oligonucléotides dans les chromosomes humains, couplé à la reconnaissance, la sélection et l'intégration des gènes désirés* »^[3].

Les énormes progrès en biologie moléculaire réalisés durant la seconde moitié du XX^{ème} siècle, conduisant notamment au séquençage du génome humain publié en 2001^[4], ont contribué à une meilleure compréhension des pathologies, de leurs étiologies et de leur fonctionnement. Ainsi se sont ouverts de nouveaux horizons thérapeutiques, dont la thérapie génique. Cette approche thérapeutique peut être définie comme le transfert d'une construction d'acides nucléiques dans des cellules cibles dans le but d'obtenir un effet curatif. Ainsi, contrairement aux médicaments qui agissent sur l'activité et le fonctionnement d'une protéine, les gènes thérapeutiques interviennent en amont, à la source même du dysfonctionnement. Les champs d'applications sont par conséquent très vastes.

Initialement imaginé pour les maladies monogéniques telles que la mucoviscidose ou l'hémophilie, le concept de thérapie génique consistait en un transfert « additif » d'une copie saine d'un gène endogène pour compenser l'anomalie de fonctionnement d'un gène altéré, et ceci dans le but de prendre en charge la production de la protéine déficiente, sans toutefois extraire le gène inopérant. Depuis, la communauté scientifique a fait preuve d'ingéniosité et a multiplié les démarches innovantes, comme le transfert de gènes codant des protéines thérapeutiques dans le but de vacciner, ou encore de détruire sélectivement des cellules cancéreuses ou infectées. Plus récemment, le transfert d'acides nucléiques a également été

développé pour effectuer de la réparation génique, plutôt que de la supplémentation. Il est également possible de moduler l'expression génique endogène en agissant sur l'acide ribonucléique (ARN), dans le but de permettre une traduction suffisamment complète pour obtenir une protéine fonctionnelle (saut d'exons)^[5], ou alors pour éliminer un transcrit à l'origine d'un processus pathologique (ARN interférence, ribozymes)^[6].

La transformation des acides nucléiques en un médicament, capable d'être libéré dans les cellules cibles du patient, est encore souvent limitée par son système de transfert (ou vecteur). En conséquence, le développement de tels vecteurs occupe une position clé dans la mise en œuvre de la thérapie génique en vue d'exploiter les avancées de la recherche génomique. Ces vecteurs peuvent être d'origine virale ou synthétique. Les vecteurs viraux sont les plus utilisés en raison de la capacité naturelle des virus à reprogrammer leur hôte par transfert de gènes. Ils renferment un génome viral modifié (recombinant) porteur du gène thérapeutique. Parallèlement, des vecteurs non viraux, tels que des polymères cationiques ou des lipides cationiques, sont activement développés pour transférer des constructions d'acides nucléiques dans les cellules avec une sécurité accrue.

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai travaillé sur l'utilisation de vecteurs lipidiques inspirés de phospholipides membranaires, développés au travers d'une collaboration entre l'équipe « Thérapie génique & cellulaire » de l'unité INSERM U1078 (dirigée par le Pr. Pierre Lehn et le Dr. Tristan Montier) et l'équipe « Phosphore & Vectorisation » de l'UMR 6521 (dirigée par le Pr. Paul-Alain Jaffrès). Les travaux qui vont être décrits par la suite portent sur l'optimisation structurale des composés de la famille des lipophosphoramidates, de façon à les rendre davantage adaptés à chacune des étapes (extracellulaires et intracellulaires) menant à la délivrance et l'expression d'un gène d'intérêt dans les cellules cibles (« transfection »). Ces travaux se sont inscrits dans le cadre du développement d'une nouvelle thérapeutique de la mucoviscidose. Une possibilité de guérison de cette maladie monogénique consisterait, en effet, à transférer le gène thérapeutique (*CFTR*) dans les cellules de l'épithélium pulmonaire afin de rétablir une hydratation suffisante du mucus tapissant les voies aériennes, et d'éviter de cette manière la destruction du tissu respiratoire.

Ainsi, après avoir décrit brièvement les avancées globales dans le domaine de la thérapie génique au cours des 20 dernières années, nous parlerons des différents types de vecteurs et leurs potentiels thérapeutiques, avant de développer davantage les vecteurs synthétiques et

les facteurs qui peuvent encore limiter leur usage en clinique. Dans la partie expérimentale, nous aborderons dans un premier temps, l'utilisation de chaînes lipidiques phytanyles ; elles permettent aux lipophosphoramidates de s'organiser selon une structure supramoléculaire hexagonale inverse qui serait bénéfique lors de la sortie endosomale, qui constitue l'une des étapes clés du processus de transfection. Etant donné que la thérapie génique non virale des maladies chroniques comme la mucoviscidose impliquerait, en l'absence de correction des cellules souches, des administrations répétées du produit thérapeutique, nous avons ensuite évalué chez la souris normale, la possibilité de transférer plusieurs fois le tissu pulmonaire en utilisant un plasmide rapporteur (1) dépourvu de dinucléotides C-G afin de limiter la réaction inflammatoire induite, et (2) optimisé pour avoir une activité transcriptionnelle soutenue dans le temps. Ensuite, nous aborderons l'insertion du motif thiophosphoramide dans l'espaceur des lipides cationiques dans le but de former des complexes suffisamment robustes pour surmonter les contraintes extracellulaires, mais tout de même capables d'être dissociés une fois internalisés dans la cellule. Dans cette partie, nous traiterons de la capacité de certains lipides cationiques développés au laboratoire à délivrer un plasmide rapporteur *via* le pôle apicale des cellules épithéliales pulmonaires, après instillation intratrachéale des complexes. Pour finir, nous évoquerons quelques résultats préliminaires de transfection de l'épithélium pulmonaire de souris *cftr*^{-/-} avec un plasmide portant une cassette d'expression *CFTR*.

Du concept de « thérapie génique » aux réalités cliniques

La thérapie génique est une approche thérapeutique basée sur l'utilisation d'acides nucléiques (ADN, ARN, ODN) exogènes pour pallier ou moduler l'expression de certains gènes cellulaires, dans le but de prévenir ou de traiter des pathologies. Cela implique donc une compréhension approfondie des bases génétiques liées aux maladies humaines ciblées.

Compte tenu du potentiel d'applications, de nombreux problèmes éthiques ont été soulevés et ont contribué à différencier clairement deux formes de transfert de gènes, qui se distinguent selon la nature des cellules à modifier génétiquement.

Si l'introduction d'un nouveau gène dans les cellules germinales animales et végétales est déjà couramment pratiquée afin, en autres, d'apporter des caractères « bénéfiques » aux espèces^[7,8], de concevoir des modèles expérimentaux de certaines maladies, ou encore d'étudier la régulation de l'expression des gènes, cette forme de manipulation est évidemment interdite chez l'homme en raison de la transmission du nouveau caractère génétique à la descendance et des risques associés. *A contrario*, la thérapie génique somatique est source d'espoir pour le traitement de nombreuses maladies génétiques, acquises et infectieuses. Il s'agit de manipuler l'expression des gènes dans les cellules non germinales (somatiques) afin de corriger une anomalie dont la correction ne sera pas transmise à la descendance. Un des principaux challenges consiste donc à élaborer des vecteurs spécifiques, efficaces et sécurisés afin de faire pénétrer un « gène-médicament »^[9] dans les cellules.

Le concept de thérapie génique commença à émerger dans les années 1960, dès qu'il fut possible de localiser les gènes « pathologiques ». Sa mise en jeu pratique n'a cependant débuté qu'à partir de 1972, lorsque la technique de l'ADN recombinant permit à Paul Berg et ses collaborateurs de préparer le premier vecteur viral, le virus simien 40^[10] (*Simian Virus 40* ou SV40), capable d'introduire du matériel génétique exogène dans des cellules de mammifères. Il fallut cependant attendre le développement des vecteurs rétroviraux, au début des années 1980, pour que soient enregistrés les premiers succès de transfert de gènes chez l'animal, démontrant le potentiel de la thérapie génique à pallier des défauts génétiques^[11]. Ces travaux débouchèrent, en 1989, sur l'initiation d'un premier essai clinique chez l'Homme^[12]. Ce dernier, s'inscrivant dans un protocole d'immunothérapie contre le cancer^[12], n'avait pourtant pas encore de visée thérapeutique. Il s'agissait d'utiliser un rétrovirus modifié pour transférer un gène bactérien dans les lymphocytes, permettant de suivre leur devenir une fois réimplantés chez les patients. La

première thérapie génique proprement dite fut réalisée en 1990, amenant la guérison partielle d'une petite fille de 4 ans, atteinte de déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine désaminase (DICS-ADA) ^[13].

Fort de ces premiers succès, le nombre d'essais cliniques augmenta de façon exponentielle durant les années 1990. Cependant, les résultats ne furent souvent pas à la hauteur des espérances, et certains événements tragiques vinrent freiner l'engouement général pour ce nouvel horizon thérapeutique. Le premier survint en 1999, avec le décès d'un jeune homme traité contre un déficit en ornithine carbamyl transférase, en raison d'une réaction inflammatoire aiguë contre le vecteur adénoviral utilisé dans l'essai ^[14]. Puis, en 2002, un essai clinique de thérapie génique destiné à soigner des enfants atteints d'un déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X (ou DICS-X ; enfant dits « bébés bulle ») conduisit au développement d'une forme de leucémie chez deux enfants traités ^[15], due à l'insertion de l'ADN rétroviral (plus particulièrement des séquences LTRs pour *Long Terminal Repeats*) au niveau du promoteur du proto-oncogène *LMO2* ^[16]. Le même protocole fut réalisé à différents endroits dans le monde et, au total, cinq enfants sur une vingtaine traités en France ^[17], en Angleterre ^[18] et en Australie ^[19], développèrent le même type de leucémie. L'un d'entre eux ne répondit pas favorablement à la chimiothérapie employée et trouva la mort en 2004.

Ces événements imposèrent un temps de réflexion à la communauté scientifique, et la question d'un moratoire concernant l'utilisation des vecteurs viraux intégratifs, et plus particulièrement des rétrovirus, fut un instant soulevée ^[20-22]. Cependant, les experts établirent que les risques potentiels liés à l'usage des rétrovirus recombinants ne contrebalançaient pas la totalité des bénéfices possibles. L'essai initial, dirigé par les Prs. Marina Cavazzana-Calvo et Alain Fisher entre 1999 et 2002 à l'hôpital Necker (Paris), est en effet considéré comme véritable succès de la thérapie génique puisque la majorité des enfants fut définitivement sauvée par le traitement génique, alors que leur espérance de vie à la naissance était très limitée ^[17]. Avec maintenant plus de dix ans de recul, sur neuf patients DICS-X traités (huit de l'essai français, et un de l'essai australien), les analyses montrent une persistance des cellules hématopoïétiques corrigées (y compris chez les patients ayant développé une leucémie), ayant permis la reconstitution d'un système immunitaire normal ainsi que le maintien de la diversité du répertoire de lymphocytes T ^[23]. On s'aperçoit alors que le niveau d'efficacité de la thérapie génique exercée est supérieur à celui de la transplantation médullaire. Or, cette stratégie thérapeutique reste encore

prédominante pour le traitement de cette maladie, alors que son taux de succès varie entre 50 et 85 %, et que le pourcentage de mortalité à 10 ans est d'environ 30 %^[24].

Afin de diminuer la dangerosité des vecteurs viraux, principalement liée au risque de génotoxicité insertionnelle, plusieurs stratégies furent imaginées. Les effets toxiques liés aux séquences LTRs rétrovirales pourraient être diminués en effectuant une délétion au niveau de la région U3 du LTR 3', ce qui entraîne l'auto-inactivation de l'*enhancer* et du promoteur des deux LTRs, après l'étape d'intégration (vecteurs dits SIN pour *Self-INactivating*). Cette stratégie nécessite l'utilisation d'un promoteur interne qui peut être tissu-spécifique^[25]. Après de nombreux essais précliniques, de tels rétrovirus sont aujourd'hui en cours d'évaluation chez des enfants DCIS-X, traités par l'équipe d'Alain Fischer, et montrent des résultats très encourageants^a. Une seconde stratégie qui pourrait limiter les risques liés à l'intégration des séquences rétrovirales, serait d'insérer des insulateurs aux extrémités des vecteurs. Ces séquences nucléiques, exerçant un rétrocontrôle négatif sur l'*enhancer*, pourraient également permettre d'inhiber en *cis*, l'activation de gènes avoisinant le site d'intégration^[26]. Il a également été envisagé d'accompagner le gène d'intérêt d'un gène dit « suicide », tel que celui de la thymidine kinase du virus herpes simplex (HSV-TK) de type 1. Dans le cas où les cellules transformées deviendraient anormalement prolifératives, cela permettrait de les éliminer par administration de la prodrogue ganciclovir^[27,28]. Ces deux derniers outils n'ont, pour l'heure, pas encore été utilisés dans des essais cliniques.

Après une période de latence, les travaux de thérapie génique reprirent et plusieurs centaines d'essais cliniques furent lancés, ciblant principalement les maladies génétiques, infectieuses, cardio-vasculaires, ainsi que certaines formes de cancer de la peau, du poumon ou de l'ovaire.

En 2006, un rapport d'un essai clinique suisse-allemand de phase I/II ayant pour but de traiter trois patients atteints de granulomatose septique chronique (CGT pour *Chronic Granulomatous Disease*), une immunodéficience atteignant les phagocytes, introduit de nouveaux espoirs^[29]. Après avoir corrigé les précurseurs hématopoïétiques CD34+ à l'aide d'un vecteur rétroviral et les avoir réimplantés aux patients, deux parmi les trois personnes traitées virent leur qualité de vie nettement améliorée durant les deux années suivantes, avec une absence d'infection. Cependant, deux années plus tard, l'un de ces deux patients trouva la mort suite à une infection bactérienne sévère^[30]. La perte de l'expression du transgène, plus que celle des cellules

^a Communication orale, S. Hacein-Bey, *Clinical benefit after SIN-retroviral gene therapy in SCID-X1*, 15^{ème} congrès de la société américaine de thérapie génique et cellulaire (ASGCT) ; Philadelphie, mai 2012

génétiqnement modifiées serait, d'après les auteurs, à l'origine de la réapparition des symptômes de la CGT ^[30].

A la fin de la même année, l'équipe du Pr. Rosenberg annonça le succès d'un protocole d'immunothérapie exercé sur des patients atteints d'un mélanome métastatique ^[31]. Les chercheurs avaient réussi à transformer les lymphocytes des patients afin que ces derniers, une fois réadministrés, expriment un TCR (*T Cell Receptor*) dirigé contre les cellules tumorales. Alors que leur pronostic vital n'était initialement que de trois à six mois, deux des dix-sept patients présentèrent des niveaux élevés de lymphocytes modifiés pendant plus d'un an, permettant une régression des lésions métastatiques. Malgré une réimplantation efficace des cellules transduites chez les quinze autres patients, le traitement s'avéra inactif dès le deuxième mois. Le suivi à plus long terme montra que l'expression du TCR était mise sous silence, suggérant d'utiliser des adjuvants immunomodulateurs afin d'inhiber ce phénomène ^[32].

En raison de la propriété des rétrovirus à n'infecter que les cellules en division, la recherche en thérapie génique s'est orientée davantage vers les vecteurs de type lentiviraux (dérivés du virus de l'immunodéficience humaine, VIH) afin de pouvoir également cibler les cellules ne se divisant pas ou peu. Entre 2006 et 2010, l'équipe du Pr. Aubourg débuta un essai clinique sur trois patients atteints d'adrénoleucodystrophie liée à l'X (ALD), une maladie démyélinisante cérébrale grave, causée par une déficience de production de la protéine ALD (transporteur à cassette de liaison à l'ADN), codée par le gène *ABCD1*. La greffe des cellules souches hématopoïétiques autologues, génétiquement modifiées à l'aide d'un lentivirus portant le gène *ABCD1*, permit un arrêt de la démyélinisation cérébrale entre le 14^{ème} et le 16^{ème} mois suivant le traitement, sans qu'aucun clone lymphoïde ne prédomine par la suite chez les trois patients traités ^[33,34]. Bien que le recul soit encore relativement limité, cette première a concrétisé les espoirs placés dans l'utilisation de vecteurs lentiviraux pour une application thérapeutique chez l'homme, les éditeurs de la revue *Science* plaçant même cet essai parmi les dix événements marquants de l'année 2009, toutes sciences confondues.

En 2007, un essai clinique de phase I/II débuta sur un homme atteint d'une forme grave de bêta-thalassémie, l'une des maladies génétiques et héréditaires les plus fréquentes parmi les populations méditerranéennes et asiatiques. Cette maladie, due à une mutation du gène codant la chaîne β de l'hémoglobine (protéine permettant le transport de l'oxygène par les globules rouges), conduit à une forte anémie qui engage le pronostic vital. Le traitement palliatif,

consistant à réaliser des transfusions sanguines régulières aux malades, entraîne à long terme l'accumulation de fer dans l'organisme, à l'origine d'atteintes cardiaques, hépatiques, et hormonales. L'autre solution thérapeutique, plus définitive, est la greffe allogénique de cellules souches de moelle osseuse. Comme pour le DICS-X, cette approche n'est pas non plus idéale car le greffon peut être rejeté par le système immunitaire du patient ou réagir contre l'hôte. L'essai de thérapie génique montra que, 30 mois après avoir réimplanté au patient ses propres cellules souches hématopoïétiques corrigées *ex vivo* (à l'aide d'un lentivirus portant une version fonctionnelle du gène déficient), plus de 10 % des cellules souches de la moelle osseuse contenaient le gène correcteur, dont 3 % des érythroblastes (donnant naissance aux globules rouges) ^[35]. La concentration globale d'hémoglobine avait suffisamment augmenté pour ne plus nécessiter de transfusions. Cependant, parmi les clones cellulaires génétiquement modifiés, l'un d'entre eux reste dominant en raison de l'insertion du transgène au niveau du gène codant la protéine HMGA2, connue pour participer à la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Même s'il faut encore rester prudent, ce clone reste stable depuis sa découverte et ne présente aucune conséquence hématologique délétère ^[35].

Les vecteurs dérivés de virus adéno-associés (ou AAV pour *Adeno-Associated Virus*) ont été fortement développés durant la dernière décennie pour leur potentiel inocuitaire. Néanmoins, le décès d'un patient impliqué dans un essai clinique de traitement de la polyarthrite rhumatoïde à l'aide d'un tel vecteur, au cours de l'été 2007, permit à certains scientifiques de pointer du doigt l'utilisation des AAVs ^[36]. Ce résultat tragique n'a pourtant toujours pas pu être imputé au traitement pratiqué, car l'analyse *post-mortem* du défunt a révélé la dissémination du virus de l'herpès ainsi qu'une colonisation par *Histoplasma capsulatum*, un champignon commun des voies respiratoires. Or, si l'affaiblissement du système immunitaire à l'origine du développement de l'agent pathogène peut être lié au vecteur utilisé, le patient était également sous traitement d'Humira® (Adalimumab), un anti-inflammatoire justement connu pour augmenter la vulnérabilité aux infections fongiques. Aujourd'hui mieux compris et donc mieux utilisés, les AAVs donnent des résultats prometteurs concernant de nombreuses maladies comme la dystrophie musculaire de Duchenne ou l'amaurose congénitale de Leber ^[37].

Toutes ces avancées, considérables, concernent principalement la correction des cellules souches sanguines à l'aide de vecteurs viraux, dans le but de recoloniser l'organisme de cellules fonctionnelles. Néanmoins, certaines pathologies comme la mucoviscidose ne semblent pas

encore pouvoir se prêter à ce genre d'approche thérapeutique. En effet, comme nous allons le voir par la suite, les cellules cibles de cette maladie se divisent lentement, et l'utilisation des cellules souches n'en est qu'à ses tous débuts. Lorsqu'il fut montré, dès 1987, que des molécules de synthèse étaient également capables de transférer des gènes sans que ceux-ci ne s'intègrent dans le génome hôte ^[38], un nouvel axe de recherche émergea avec l'idée de créer de véritables virus artificiels totalement sécurisés. Leur utilisation semblait par ailleurs particulièrement adaptée à la mucoviscidose, car l'absence de protéines à la surface des vecteurs synthétiques limiterait leur reconnaissance par le système immunitaire, permettant en théorie d'être administrés à plusieurs reprises de façon à maintenir une activité du gène thérapeutique suffisante durant toute la vie du patient. C'est ainsi qu'en 1995, six ans après avoir découvert le gène déficient dans la mucoviscidose (*CFTR*), un premier essai de thérapie génique non virale fut mené sur plusieurs patients, conduisant à la correction partielle du défaut protéique ^[39]. De nombreux autres essais précliniques et cliniques suivirent, chacun apportant son lot d'enseignements. Globalement, l'ensemble des résultats obtenus avec les vecteurs synthétiques – efficacité modeste et transitoire, toxicité faible mais réelle – a mis en évidence qu'il était indispensable de développer des formulations plus performantes, basées sur des vecteurs permettant un transfert plus efficace et/ou des plasmides assurant une meilleure expression (niveau, durée) du transgène *CFTR*.

Chapitre I: LA MUCOVISCIDOSE

I Historique et généralités

Parmi les maladies rares, la mucoviscidose est la plus fréquente des maladies monogéniques héréditaires dans les populations d'origine européenne. Cette maladie touche principalement les organes respiratoires et digestifs.

La mucoviscidose a été initialement décrite à la fin des années 1930 par Guido Fanconi^[40], avant d'être considérée comme une entité pathologique distincte quelques années plus tard par Dorothy Andersen sous l'appellation de « fibrose kystique du pancréas » (d'où sa terminologie anglo-saxonne de *cystic fibrosis*, CF), en raison de la fréquence des atteintes pancréatiques associées^[41]. Le terme de mucoviscidose, association des termes « mucus » et « visqueux » fut utilisé pour la première fois en 1943 par le Dr. Sydney Farber. Dans les années 1950, le Dr. Paul di Sant'Agnese mit en évidence des anomalies électrolytiques dans la sueur des malades, et plus particulièrement une forte augmentation du chlorure de sodium (NaCl), ce qui permit d'envisager un diagnostic spécifique de la maladie par le test dit « de la sueur ». En 1983, une anomalie de transport des ions chlorure (Cl⁻) fut mise en évidence par Paul Quinton au niveau des glandes sudoripares^[42], et par Michael Knowles au niveau de l'épithélium pulmonaire^[43]. Le développement de la génétique inverse permit, en 1989, aux équipes des Drs. Lap-Chee Tsui, Francis Collins et John Riordan, d'isoler le gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) impliqué dans la maladie^[44-46]. Son clonage a ainsi ouvert la voie à la thérapie génique ainsi qu'à l'étude de la protéine codée, CFTR, qui a mené aux approches pharmacologiques actuelles visant à restaurer le fonctionnement d'une protéine anormale.

II Le gène *CFTR* et ses mutations

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive. En France, son incidence est d'environ une naissance sur 4 200, avec d'importantes disparités selon les régions^a [47]. En effet, cette maladie est particulièrement fréquente en Bretagne, notamment dans le Finistère où un nouveau-né sur 2 000 environ est atteint. De plus, certaines mutations dites « rares » sont fréquentes dans cette région, témoignant vraisemblablement d'effets fondateurs [48].

A l'échelle nationale, ce sont environ 200 enfants qui naissent chaque année avec la mucoviscidose. Un français sur 32 (soit deux millions de personnes) est porteur sain d'un allèle *CFTR* muté^b.

1. Le gène *CFTR*

Situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31.2) (Figure 1), le gène *CFTR* s'étend sur 189 kb d'ADN génomique et comporte 27 exons (Figure 2)^[49]. Il est transcrit en un acide ribonucléique messenger (ARNm) de 6,1 kb dont la séquence codante est de 4,4 kb.

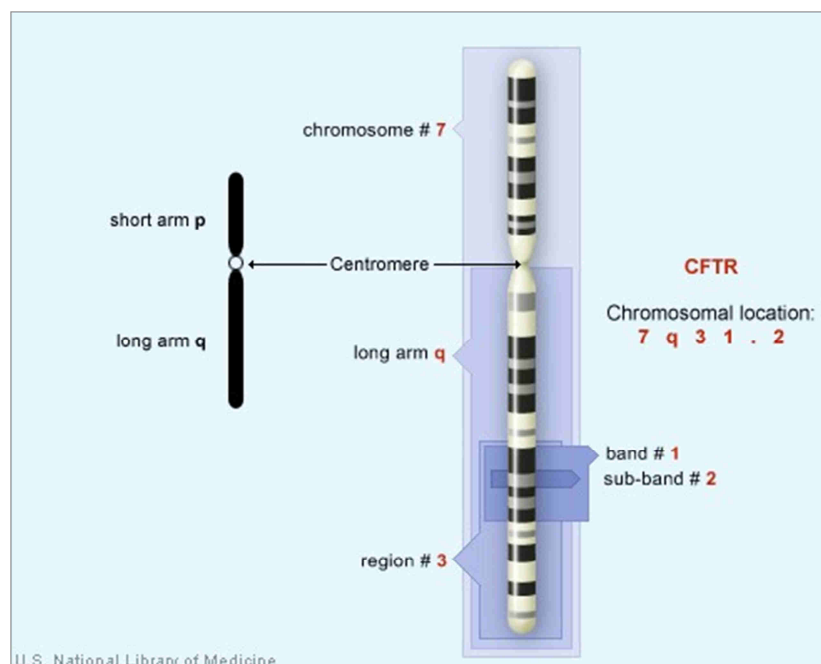


Figure 1 : Localisation chromosomique du gène *CFTR* ^c

^a De 1/2 700 en Bretagne à 1/7 000 dans la région Midi-Pyrénées

^b Source : <http://www.vaincrelamuco.org>

^c Source : <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/chromosomallocation.jpg>

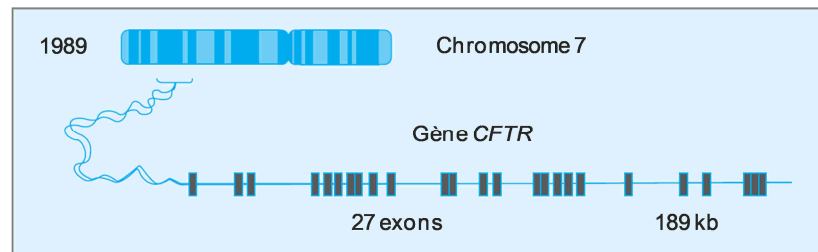


Figure 2 : Structure du gène *CFTR* (modifiée d'après ^[50])

Plus de 1 900 mutations du gène *CFTR* ont déjà été décrites à ce jour^a. La plus fréquente est la mutation $\Delta F508$ qui correspond à la délétion d'une phénylalanine située dans l'exon 10, en position 508. Elle est retrouvée dans environ 70 % des allèles, avec des variations importantes selon les populations ^[47]. Les autres mutations décrites sont de type faux-sens, microdélétions et micro-insertions (entraînant un décalage du cadre de lecture), non-sens, ou affectant l'épissage. Quelques grandes délétions ont également pu être observées. Cependant, seules quelques-unes de ces mutations sont retrouvées chez plus de 1 % des patients, comme par exemple les mutations G542X, G551D, W1282X et N1303K. Certaines n'ont d'ailleurs été identifiées que chez un seul individu (ces mutations sont dites « privées »).

2. Les différentes classes de mutations du gène *CFTR*

Les mutations du gène *CFTR* entraînent des anomalies de la protéine qui peuvent être regroupées en six classes selon leur conséquences fonctionnelles (Figure 3) ^[51].

- **Mutations de classe I :** Cette classe regroupe les mutations non-sens et les mutations produisant un codon stop prématuré (mutation au niveau d'un site d'épissage ou mutation décalant la phase de lecture). Les mutations G542X, R553X et W1282X conduisent par exemple à l'apparition d'un codon stop, à l'origine d'un ARNm instable et rapidement dégradé. Ces mutations résultent en une absence totale ou partielle de la protéine.

- **Mutations de classe II :** Ces mutations engendrent un défaut de maturation de la protéine CFTR et d'adressage à la membrane plasmique. En effet, CFTR est une protéine

^a Source : <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>

glycosylée et sa biosynthèse implique par conséquent un passage par le réticulum endoplasmique (RE) où ont lieu le repliement, le début de la N-glycosylation ainsi qu'un « contrôle qualité », puis par l'appareil de Golgi où a lieu la glycosylation mature. La mutation $\Delta F508$ est l'exemple type de cette classe de mutations. Le repliement post-traductionnel de cette protéine est perturbé, ce qui conduit à sa reconnaissance par le « contrôle qualité » du RE, et à sa dégradation par le protéasome.

- **Mutations de classe III** : Les protéines mutées sont correctement acheminées à la membrane apicale des cellules, mais elles y présentent un défaut d'activation^[52]. Par exemple, le mutant G551D est situé dans le domaine NBD1 (*Nucleotide Binding Domain 1*) et empêche la liaison et l'hydrolyse de l'ATP.

- **Mutations de classe IV** : Ces mutations, positionnées dans les domaines transmembranaires participant à la formation du pore ionique, conduisent à une protéine correctement positionnée, mais présentant un défaut de conduction ionique (diminution du flux d'ions et sélectivité altérée).

- **Mutations de classe V** : Les protéines mutées ont une activité normale mais un taux de synthèse diminué. Ce sont des mutations qui se situent dans le promoteur ou qui affectent l'épissage des transcrits, conduisant à une synthèse inefficace de la protéine.

- **Mutations de classe VI** : Cette classe de mutations produit une protéine CFTR tronquée au niveau de son domaine C-terminal, moins stable une fois localisée à la membrane apicale^[53].

Ce type de classification a pour but de prédire le phénotype des patients mucoviscidosiques en fonction de leur génotype, et ainsi de proposer une prise en charge précoce et adaptée. Les mutations de classes I à III sont les plus sévères puisque les cellules affectées ne présentant pas ou peu de protéine CFTR. Les formes dites « peu sévères » (mutations de classe IV, V et VI) se traduisent chez les patients par une espérance de vie d'environ 50 ans, alors qu'elle se situe autour de 30 ans pour les formes sévères qui sont, dans une grande majorité, représentées par des patients porteurs homozygotes de la mutation $\Delta F508$ ^[54]. Cependant, la corrélation

génotype-phénotype est loin d'être parfaite, des malades aux génotypes identiques ayant fréquemment des atteintes différentes.

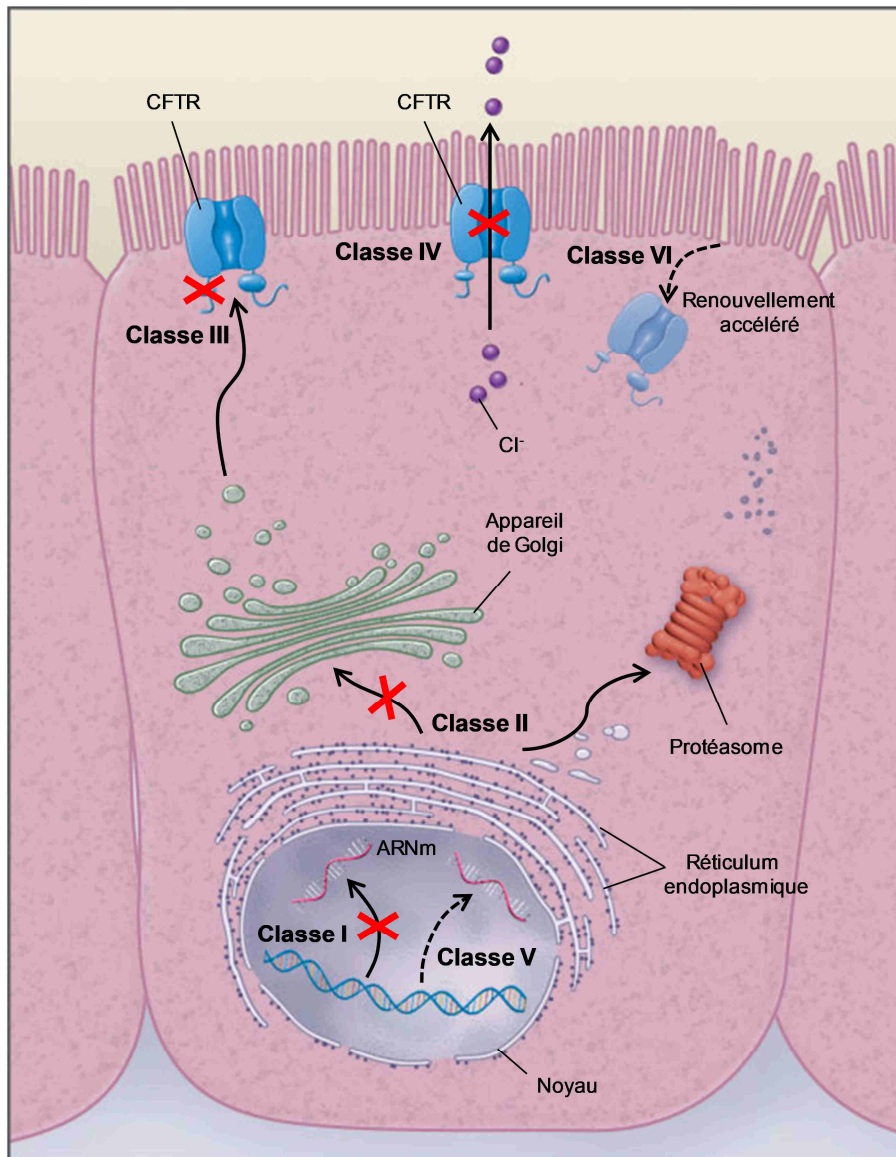


Figure 3 : Conséquences fonctionnelles des six classes de mutation du gène *CFTR* (modifiée d'après ^[51])

III La protéine CFTR sauvage

Composée de 1 480 acides aminés et ayant un poids moléculaire 168 kDa (sous sa forme mature), CFTR est une glycoprotéine transmembranaire qui appartient à la superfamille des transporteurs ABC (*Adénosine triphosphate (ATP)-Binding Cassette*) ([Figure 4](#))^[55]. Retrouvés dans toutes les espèces, ces transporteurs sont capables, en hydrolysant l'ATP, de transporter des éléments très variables à travers les membranes cellulaires tels que des acides aminés, des peptides, des protéines, des ions organiques et inorganiques, certaines toxines, voire même des antibiotiques^[56].

1. Structure de la protéine CFTR

La protéine CFTR comporte deux domaines NBD (*Nucleotide Binding Domain*) capables de fixer l'ATP et deux domaines MSD (*Membrane Spanning Domain*) formant chacun six hélices α transmembranaires, ainsi qu'un domaine particulier dit « régulateur » (R) ([Figure 4](#)).

D'après les profils d'hydrophobicité, 77 % des acides aminés qui composent la protéine CFTR sont dans le cytoplasme, 19 % dans les segments transmembranaires et 4 % dans les boucles extracellulaires^[46,57-60]. Les domaines N et C terminaux de la protéine sont cytoplasmiques, et la boucle reliant les segments transmembranaires M7 et M8 contient des sites de glycosylation^[57,59].

- **Les domaines transmembranaires MSD** interviennent dans la formation du pore et la sélectivité du canal aux ions chlorure. La présence de résidus chargés dans les segments transmembranaires influe sur les propriétés de conductivité du CFTR, les acides aminés chargés positivement attirant les anions vers l'intérieur du canal^[61-63]. Cependant, malgré de nombreuses investigations menées sur le sujet, les régions précises formant le pore du canal demeurent incertaines, tout comme leurs fonctions exactes.

- Le **domaine de régulation R** est spécifique au canal CFTR, sa phosphorylation par les protéines kinases A et C étant nécessaire à l'ouverture du canal par le MgATP^[46,64]. Deux sous-domaines composent le domaine de régulation. Le sous-domaine RD1 (*Regulatory Domain 1*) est impliqué dans la maturation de la protéine, et probablement dans l'ouverture du canal par modulations des interactions entre NBD1 et les sites de phosphorylation du

domaine R^[65]. Le sous-domaine RD2 comporte la majorité des résidus sérine phosphorylables, et a ainsi pu être défini comme la partie fonctionnelle du domaine R^[66].

- Les **domaines de liaison aux nucléotides NBD1 et NBD2** comportent les sites consensus de liaison à l'ATP (Walker A et Walker B^[67]), ainsi qu'une séquence commune à tous les transporteurs ABC, le motif C, situé à la surface des NBDs, proche des sites de liaison à l'ADN^[68]. Les deux domaines NBD coopèrent afin de réguler les mécanismes d'ouverture/fermeture ATP-dépendants du canal CFTR. L'ouverture du canal nécessite la liaison d'une molécule d'ATP sur les deux domaines, mais seule l'hydrolyse de l'ATP lié au NBD2 est impliquée dans l'ouverture du canal^[69].

- Les **boucles intra-cytoplasmiques**, reliant les segments transmembranaires impliqués dans la formation du pore, ne participent pas directement aux mouvements ioniques, à l'inverse des **boucles extracellulaires** qui peuvent influencer la sélectivité du canal^[70].

Enfin, de nombreuses études de modélisation ont été menées au cours des dernières années afin d'identifier la structure tridimensionnelle du domaine NBD1^[71,72], puis de la protéine CFTR entière^[73,74]. Récemment, un modèle atomique des états « ouvert » et « fermé » de CFTR a également été proposé^[75] (Figure 4B). Ces prédictions sont intéressantes car elles procurent une base moléculaire pour une meilleure compréhension du fonctionnement du canal CFTR.

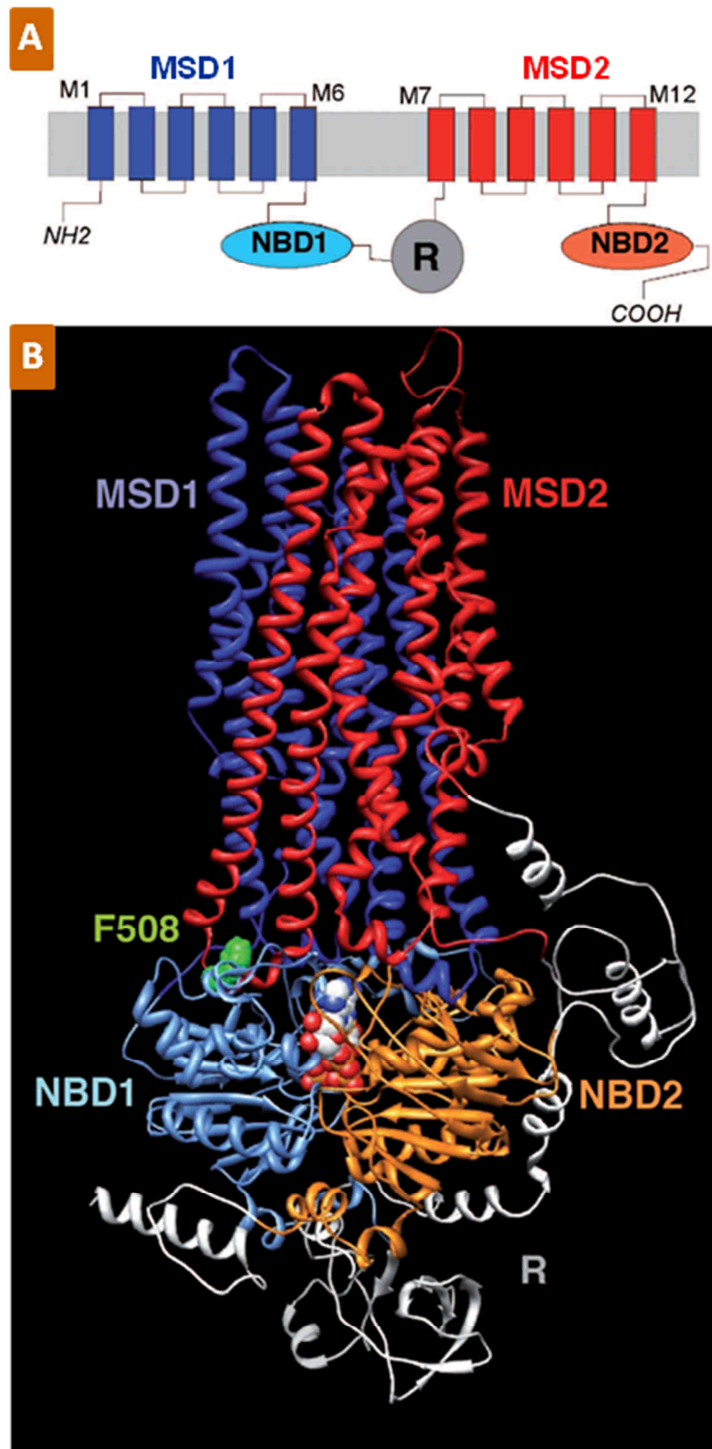


Figure 4 : (A) Représentation structurale simplifiée de la protéine CFTR (TM : *Transmembrane Domain* ; NBD : *Nucleotide Binding Domain* ; MSD : *Membrane Spanning Domain* ; M : hélices transmembranaires ; R : domaine régulateur). (B) Modèle structural de la protéine CFTR sous sa forme ouverte (d'après ^[75], dans ^[76]). Est également représenté l'acide aminé F508 (en vert, situé à l'interface de NBD1 et des domaines transmembranaires de la protéine).

Bien que de nombreux points restent à éclaircir, les données expérimentales obtenues sur le fonctionnement du canal CFTR pourraient être représentées par le schéma suivant (Figure 5) :

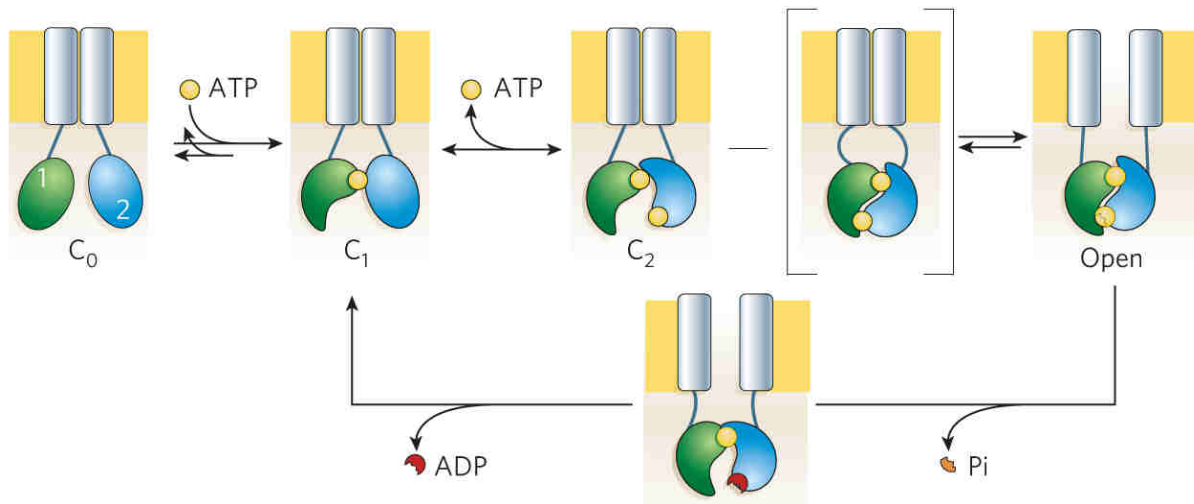


Figure 5 : Interprétation du fonctionnement du canal CFTR. (NBD1, NBD2 et ATP apparaissent respectivement en vert, bleu et jaune. C_0 , C_1 et C_2 représentent les différents états fermés du canal ; le domaine R a été omis^[77]).

Après phosphorylation des sérines du domaine R par la protéine kinase A, elle-même activée par l'adénosine monophosphate cyclique (d'où le caractère AMPc dépendant de CFTR), le CFTR fixerait l'ATP au niveau de NBD1 et NBD2 qui se rapprocheraient alors étroitement pour former un dimère, piégeant à son interface les deux molécules d'ATP. Cette formation permettrait alors l'ouverture du canal, position qui serait maintenue jusqu'à l'hydrolyse de l'ATP au niveau du site catalytique de NBD2 et la séparation des deux NBDs^[78,79]. Le canal pourrait alors se fermer et le resterait jusqu'à la fixation d'une nouvelle molécule d'ATP au niveau des NBDs.

2. Fonctions de la protéine CFTR

La protéine CFTR est un canal chlorure localisé dans la partie apicale des cellules épithéliales à fonction exocrine, permettant la sortie des ions Cl^- au niveau des voies digestives et respiratoires. Avant de lui connaître cette fonction, et comme son nom l'indique, on attribuait surtout au CFTR des propriétés régulatrices de conductance ionique transmembranaire^[80] (Figure 6).

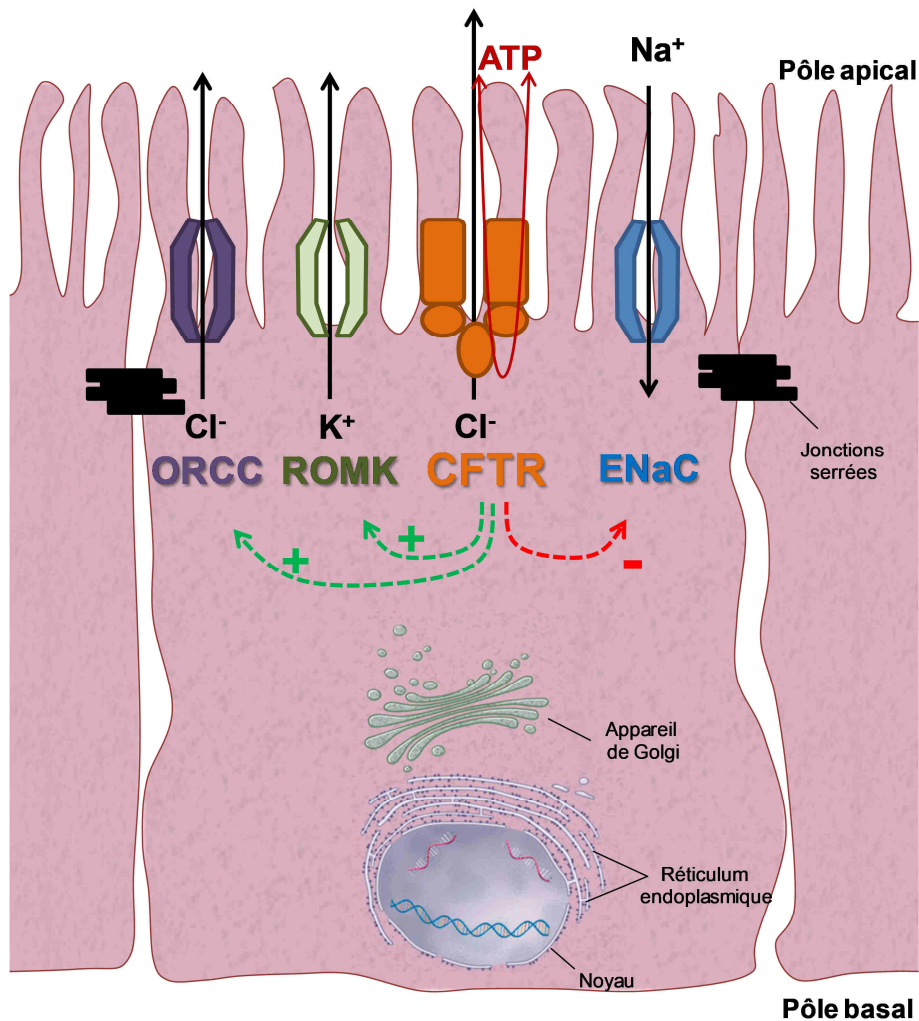


Figure 6 : Schéma représentant les différents transporteurs ioniques régulés par la protéine CFTR (modifié d'après^[81]). ORCC (*Outwardly Rectifying Chloride Channel*), ROMK (*Renal Outer Medullary Potassium channel*), ENaC (*Epithelial Sodium Channel*).

En effet, de nombreuses anomalies ont été observées au sein des épithéliums mucoviscidosiques, incluant entre autre, une hyperabsorption des ions sodium au niveau du canal ENaC (*Epithelial Sodium Channel*), une régulation altérée des canaux chlorure ORCC (*Outwardly Rectifying Chloride Channel*) et potassium ROMK (*Renal Outer Medullary Potassium channel*) (Figure 6)^[81]. En régulant ces divers canaux ioniques, le CFTR sauvage

permet des mouvements aqueux optimaux et ainsi le maintien de l'homéostasie du fluide périciliaire ^[82]. En revanche, dans la mucoviscidose, son dysfonctionnement entraîne la formation, par déshydratation, d'un mucus hypervisqueux, dont la stagnation engendre des occlusions intestinales et procure des conditions idéales à des infections opportunistes, principalement au niveau pulmonaire. CFTR participe ainsi à l'équilibre hydro-électronique entre les deux faces de la membrane. Une différence de potentiel transépithélial est d'ailleurs mesurable, notamment dans la muqueuse nasale, celle-ci étant plus élevée chez les patients mucoviscidosiques. Par ailleurs, au niveau cutané, la maladie se traduit par une anomalie de la réabsorption des ions chlorure par l'épithélium des canaux excréteurs des glandes sudoripares, d'où une sueur riche en NaCl.

En tant que transporteur ABC, le CFTR est également perméable à d'autres ions et à différentes molécules. On peut citer les ions monovalents halogénures (Br^- , I^- et F^-) ^[83], les ions polyatomiques (l'ion bicarbonate HCO_3^- et l'ion nitrate NO_3^- entre autres) ^[84], mais également le tripeptide glutathion ^[85] et l'ATP ^[86].

IV Physiopathologie et principales manifestations cliniques de la mucoviscidose

La mucoviscidose touche l'ensemble des tissus épithéliaux à fonction exocrine de l'organisme. Ces tissus se retrouvent dans de nombreux organes : les voies respiratoires (bronches, cavités nasales...), le tractus digestif (intestins, pancréas, foie et voies biliaires), les canaux déférents des organes génitaux masculins, les glandes sudoripares, ainsi que les sinus (Figure 7).

La sévérité des manifestations cliniques varie selon le type de mutation du gène *CFTR*, mais également selon des facteurs génétiques et environnementaux.

L'anomalie génétique à l'origine de la mucoviscidose perturbe le fonctionnement de plusieurs organes, car différents conduits finissent par être obstrués par un mucus (ou autres sécrétions) épais et visqueux.

• LES VOIES RESPIRATOIRES

L'encombrement et l'infection des bronches gêne la respiration. L'inflammation chronique détruit progressivement les poumons. L'atteinte pulmonaire est responsable de la plupart des décès des patients.

• LE FOIE

Chez environ 5% des patients, l'obstruction des petits canaux biliaires perturbe le fonctionnement du foie et la digestion.

• LE PANCRÉAS

Chez environ 85% des malades, l'obstruction des canaux empêche le pancréas de déverser dans l'intestin les enzymes digestives indispensables. Un diabète peut apparaître.

• L'INTESTIN GRÊLE

Chez environ 10% des nouveau-nés atteints, un bouchon épais obstrue l'intestin et nécessite une intervention chirurgicale.

• L'APPAREIL REPRODUCTEUR

L'absence des petits conduits, tels que les canaux déférents, rend stérile 95% des hommes atteints. Les femmes peuvent également être stériles en raison d'un épais bouchon de mucus qui limite la pénétration des spermatozoïdes dans l'utérus.

• LA PEAU

En raison d'un mauvais fonctionnement des glandes sudoripares, la transpiration contient un excès de sel (chlorure de sodium). On diagnostique la maladie en mesurant la concentration en ions chlorure dans la sueur.

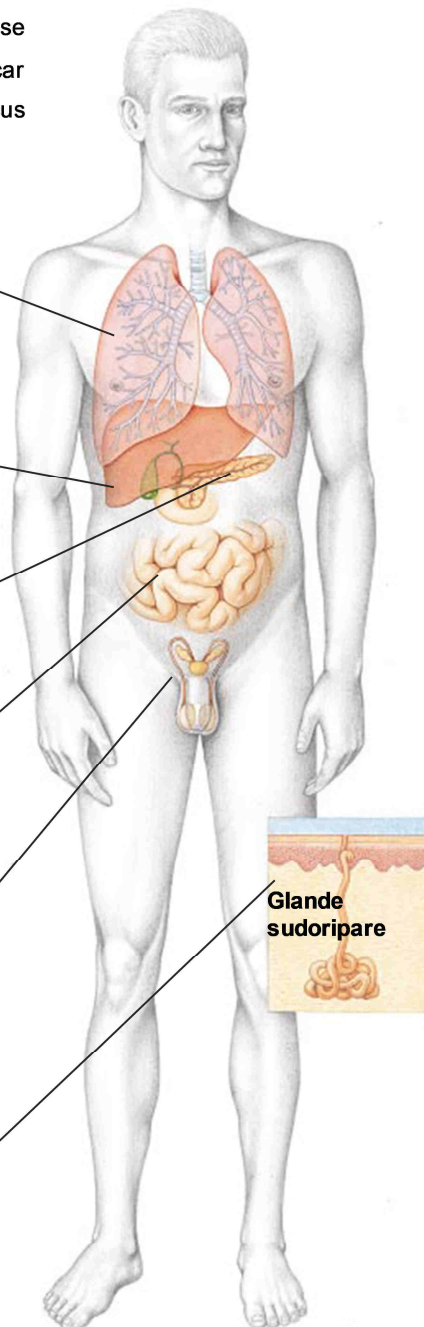


Figure 7 : Les principaux organes touchés par la mucoviscidose (modifiée d'après ^[87])

1. Manifestations pulmonaires

Le dérèglement du transport d'électrolytes au niveau épithélial (absence de sécrétion d'ions chlorure et hyperabsorption d'ions sodium) a pour conséquences la déshydratation et l'augmentation de la viscosité du mucus recouvrant les voies aériennes. A terme, ceci entraîne une occlusion progressive des voies respiratoires, créant un environnement propice aux infections bactériennes opportunistes. La difficulté à évacuer les poussières, bactéries et champignons, associée à une diminution des propriétés antibactériennes du mucus, favorisent l'apparition d'une infection précoce devenant rapidement chronique, accompagnée d'une réaction inflammatoire^[88]. Ainsi, les atteintes pulmonaires dues à la colonisation par des bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* puis *Pseudomonas aeruginosa* à un stade plus avancé de la maladie, sont à l'origine de pneumopathies graves, constituant la principale cause de mortalité chez les patients^[89]. En effet, les cycles d'inflammation/surinfection par des bactéries devenant au fil de temps multi-résistantes aux antibiotiques, aboutissent à une fibrose sévère du tissu pulmonaire et par conséquent, à une insuffisance respiratoire majeure.

2. Manifestations intestinales

Une obstruction intestinale, liée à une mauvaise hydratation des selles, se manifeste par un iléus méconial (rétention des selles primitives) dès les premiers jours de vie chez 10 à 20 % des nouveau-nés. Un syndrome d'occlusion intestinale distale (SOID) peut également survenir chez les patients. L'occlusion intestinale a d'ailleurs été la cause principale de mortalité jusqu'à l'utilisation des lipases.

3. Manifestations pancréatiques

L'insuffisance pancréatique exocrine, retrouvée chez environ 90 % des patients, représente l'atteinte digestive majeure. Chez les malades, les canaux pancréatiques se bouchent, et les enzymes du pancréas (lipase, trypsine,...) qui sont normalement excrétées dans la lumière intestinale, vont agresser le tissu pancréatique et induire une fibrose. Tous ces éléments conduisent à un défaut d'absorption des graisses, des protéines et des vitamines liposolubles, qui va entraîner une diarrhée chronique grasseuse, un défaut de croissance, un retard

pubertaire, une anémie et des troubles carenciels ^[90]. L'apparition d'un diabète est également fréquent à l'âge adulte, d'une part parce que les cellules β des îlots de Langerhans sécrétant l'insuline sont altérées au fil du temps et, d'autre part, en raison des infections récurrentes et des traitements par corticoïdes qui provoquent une insulino-résistance.

4. Manifestations hépatobiliaires

L'atteinte du foie survient dans 15 à 20 % des cas. De nombreuses lésions hépatiques et des voies biliaires existent, liées à l'obstruction des canaux par la bile épaissie.

L'évolution peut se faire vers la cirrhose biliaire, elle-même pouvant être responsable de troubles de la circulation sanguine au niveau de la veine porte (hypertension portale).

5. Manifestations génitales

Même si les grossesses de femmes atteintes ne sont plus rares de nos jours, une hypofertilité due à un épaississement de la glaire cervicale peut être observée ^[91]. En revanche, une stérilité masculine est présente dans 98 % des cas, causée par une agénésie des canaux déférents.

6. Autres manifestations

L'atteinte des voies aériennes supérieures est fréquente et se manifeste par une sinusite chronique et, plus rarement, par la formation de polypes nasaux.

L'anomalie de transport ionique au niveau des glandes sudoripares conduit à un excès de NaCl dans la sueur, cette perte de sel pouvant être responsable de déshydratation aiguë dans certains cas (chaleur et effort).

V Diagnostic et dépistage néonatal

1. Diagnostic

Les circonstances de dépistage de la mucoviscidose sont variables. La maladie est parfois révélée dès la naissance par un iléus méconial hyperéchogène. Chez le nourrisson, le prolapsus rectal (extériorisation du rectum) est évocateur, et justifie le dosage des ions chlorure dans la sueur. Ce « test de la sueur », décrit pour la première fois en 1959 ^[92], est positif lorsque la concentration d'ions chlorure dans la sueur est supérieure à 60 mmol/L. Si celui-ci est positif, des analyses génétiques consistant à rechercher les mutations les plus fréquentes sont effectuées. Si ce génotypage ciblé est négatif, l'ensemble des exons est analysé.

2. Dépistage

a) Dépistage néonatal

En France, depuis 2002, un dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose est réalisé par dosage de la trypsine immunoréactive (TIR, une proenzyme sécrétée par le pancréas et circulant dans le sang) sur une goutte de sang prélevée à la maternité ^[93]. Ce test est fiable et permet, lorsque la concentration détectée est supérieure à 60 µg/L, la recherche de mutations et la prise en charge précoce de l'enfant. Le dépistage néonatal a ainsi permis d'améliorer la qualité et la durée de vie des patients.

b) Dépistage prénatal

Dans le cas d'antécédents familiaux ou de la connaissance de l'hétérozygotie d'un membre du couple, il est possible d'effectuer un diagnostic prénatal en cas de grossesse. L'analyse du génome foetal à partir d'une biopsie des villosités choriales peut également être réalisée de façon fiable dès la 10^{ème} semaine d'aménorrhée. Si cette analyse est impossible, une amniocentèse peut être pratiquée à partir de la 18^{ème} semaine. Celle-ci peut également être demandée par les médecins lors d'une échographie, en cas de découverte d'une obstruction intestinale ou en l'absence d'une vésicule biliaire visible ^[94]. En France, quelques diagnostics préimplantatoires ont également été réalisés chez des familles déjà touchées.

VI Prise en charge et traitements symptomatiques

En l'absence de traitement curatif, de nombreux traitements palliatifs sont proposés afin de soulager les troubles respiratoires et digestifs des patients (Tableau I). Grâce à leur amélioration, ainsi qu'à la prise en charge globale et précoce de la maladie, l'espérance de vie des malades est passée de 7 ans en 1965 à 47 ans en 2011^a. Cependant, la prise en charge reste particulièrement lourde et astreignante pour le patient et sa famille.

Tableau I : Traitements palliatifs actuels de la mucoviscidose^b

	Traitements	Médications
Manifestations pulmonaires	Kinésithérapie respiratoire	Gilet gonflable
	Fluidification du mucus	Pulmozyme, solution saline hypertonique
	Anti-inflammatoires	Ibuprofène
	Antibiothérapie	TOBI, azithromycine, Cayston
Manifestations digestives	Vitamines	AquADEKs
	Enzymes pancréatiques	Pancrealipase

Le **traitement de l'atteinte des voies aériennes** repose essentiellement sur la kinésithérapie respiratoire, permettant de désencombrer l'arbre bronchique du mucus épais et visqueux qui l'obstrue, ainsi que sur l'antibiothérapie pour prévenir et contrôler les infections. Afin de fluidifier le mucus et ainsi de faciliter la kinésithérapie respiratoire, on utilise des mucolytiques et la rhDNase (Pulmozyme[®]), une désoxyribonucléase recombinante humaine hydrolysant l'ADN issu des débris bactériens et cellulaires qui contribuent à épaissir le mucus. Des anti-inflammatoires (notamment des corticoïdes) et des bronchodilatateurs sont également utilisés. Cependant, la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) à long terme entraîne des effets secondaires tels qu'une immunodéficience, qu'il faut prévenir grâce à un régime alimentaire adéquat ainsi que certaines suppléments. Dans les atteintes les plus

^a Source : Registre Français de la Mucoviscidose

^b Source : <http://www.cff.org>

sévères et les plus avancées, l'oxygénothérapie devient indispensable et la seule alternative réelle (envisagée en dernier recours) consiste en une transplantation pulmonaire.

Le **traitement des manifestations digestives** - grâce à des extraits pancréatiques gastrorésistants, et une supplémentation en vitamines A, D, E, et K, en oligoéléments et en sel - est également essentiel, car un mauvais état nutritionnel peut provoquer un retard staturo-pondéral et aggraver la capacité respiratoire.

D'autres manifestations cliniques sont également traitées (osseuses, ORL, ...). De plus, la prise en charge globale de la maladie inclut également l'éducation thérapeutique du patient, sa qualité de vie, sa scolarité ainsi que ses projets professionnels et familiaux. Le recours à un soutien psychologique est souvent nécessaire.

La recherche dans le domaine des traitements palliatifs de la mucoviscidose est très active et de nombreux essais cliniques avancés sont recensés (Tableau II).

Tableau II : Essais cliniques en cours concernant le traitement palliatif de la mucoviscidose ^a

	Essais cliniques				Au patient
	Pré-clinique	Phase 1	Phase 2	Phase 3	
Fluidifiants					Solution saline hypertonique
					Bronchitol®
		Gilead GS9411			
Mucolytique					Pulmonzyme®
Anti-inflammatoires					Ibuprofène
					N-Acétylcystéine orale
					Acide docosahexaénoïque (DHA)
					KB001
					GSK SB 656933
					Sildénafil
Anti-infectieux					TOBI®
					Azithromycine
					Cayston®
					Poudre de tobramycine inhalée (TIP)
					Lévofloxacine inhalée
					Arikace™
					Fosfomycine-Tobramycine
				Poudre de ciprofloxacine inhalée	
Anti-rejet					Cyclosporine inhalée
Supplémentation nutritionnelle					AquADEKs®
					Pancrealipase
					Liprotamase

^a Source : <http://www.cff.org/research/DrugDevelopmentPipeline/>

D'autre part, une connaissance plus approfondie de la génétique des bactéries à l'origine de la plupart des infections (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* ou encore *B. cepacia*) pourrait déboucher sur de nouvelles thérapies anti-infectieuses, notamment par l'utilisation de molécules inhibant la production des facteurs de virulence ou d'antibiotiques capables d'échapper aux mécanismes de résistance. Ces infections font également l'objet d'un développement vaccinal^[95]. Récemment, il a été montré que le mucus tapissant les voies aériennes du modèle cochon de la mucoviscidose était, dès la naissance, plus acide que la normale, inhibant les défenses naturelles contre les germes infectieux^[96]. Des traitements capables de rendre le mucus plus basique pourraient ainsi contribuer à prévenir les infections chez les patients.

Les recherches s'orientent également vers les interactions entre les partenaires cellulaires (polynucléaires neutrophiles, par exemple) et chimiques impliqués dans l'inflammation, afin de contrer les mécanismes pro-inflammatoires ou de stimuler ceux qui sont anti-inflammatoires^[97].

Enfin, un vaste projet de recherche en transplantation pulmonaire est actuellement mené en Europe, portant sur des aspects très divers de la greffe (chirurgicaux, immunologiques, infectieux, psychologiques...).

VII Nouvelles thérapies

Le traitement des symptômes reste lourd (plusieurs heures et des dizaines de gélules par jour) et beaucoup de malades meurent encore jeunes. Il s'agit donc de mettre au point de nouveaux traitements ciblant l'origine même de la maladie, et ainsi marquer une véritable « rupture thérapeutique ». Certains travaux sont porteurs de grands espoirs pour le futur.

1. Thérapie de la protéine

Désormais, de nouvelles thérapies ciblent l'anomalie protéique, en fonction du type de mutation^[98]. D'après les experts, il suffirait de restaurer une petite fraction de protéines CFTR fonctionnelles, de l'ordre de 5 à 10 %, pour normaliser le transport transépithélial de fluides et envisager un bénéfice clinique significatif.

Ainsi, des **molécules de translecture** peuvent permettre de court-circuiter les codons stop prématurés et d'aboutir ainsi à la synthèse d'une protéine fonctionnelle (Figure 8A)^[99]. Après de premières études cliniques avec des aminoglycosides, la molécule PTC124 (*Ataluren*, *PTC Therapeutics*; PTC pour *Premature Termination Codon*) fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase III. Elle est d'ailleurs également testée pour le traitement d'autres maladies génétiques, comme la myopathie de Duchenne, chez des patients porteurs de mutations non-sens^[100].

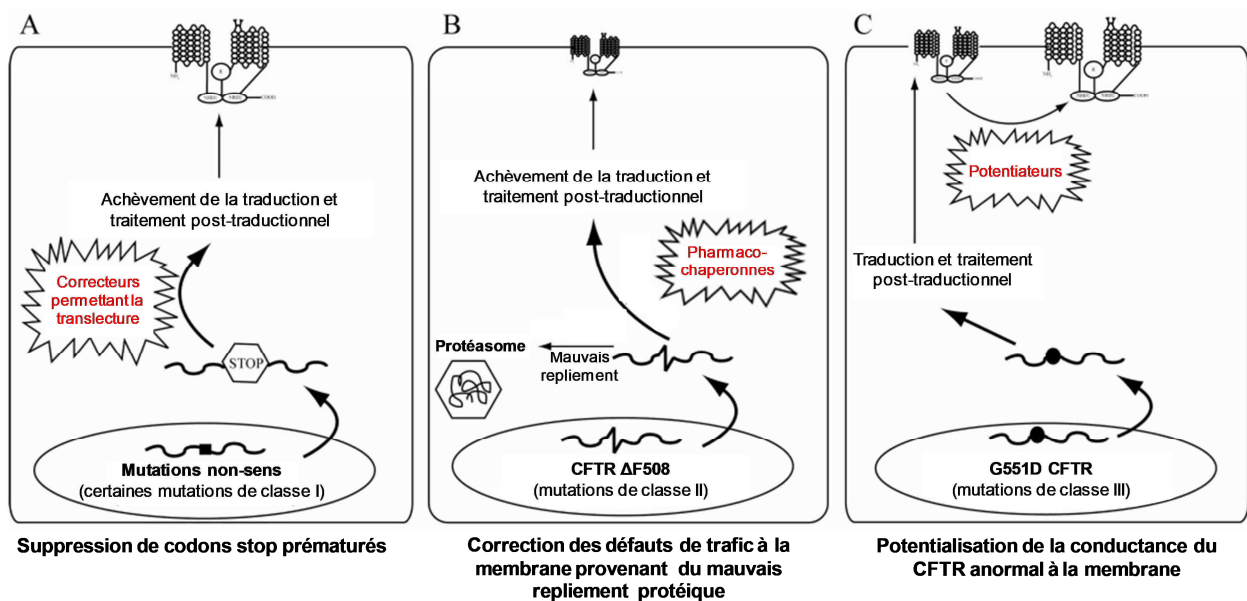


Figure 8 : Thérapies protéiques en cours d'évaluation (modifiée d'après^[98])

Par ailleurs, des **molécules correctrices** (« **pharmacochaperones** ») agissent sur le défaut de maturation des mutants CFTR de classe II, tel $\Delta F508$, permettant aux protéines mutées de migrer à la membrane cellulaire pour y remplir (au moins partiellement) leur fonction (Figure 8B). Si le Miglustat n'a pas donné de résultats significatifs lors des évaluations cliniques ^[101,102], d'autres correcteurs sont testés, tel que le Vx-809 (Vertex) pour lequel des résultats encourageants lors d'essais cliniques de phase IIa chez les patients homozygotes $\Delta F508$ ont été récemment rapportés ^[103]. Un énorme projet lancé aux Etats-Unis dans le but d'examiner de manière systématique les **molécules pouvant potentialiser l'activité de protéines défectueuses** (CFTR mutés de classe III ; Figure 8C) a permis de faire émerger une molécule particulièrement efficace pour les patients porteurs de la mutation G551D ^[104]. En effet, le Vx-770 (Kalydeco™, Vertex) a montré une restauration de la sécrétion des ions chlorure, tant au niveau de l'épithélium nasal que sudoral, et surtout un bénéfice respiratoire (augmentation du Volume Expiratoire Maximum par Seconde, VEMS) dès le premier mois de traitement ^[104,105]. Cette molécule est d'ores et déjà sur le marché aux Etats-Unis depuis le début de l'année 2012, et devrait bientôt arriver en Europe. Si cette avancée est importante pour les malades (dont une cinquantaine de personnes en France), le prix du traitement individuel laisse néanmoins songeur : environ 230 000 euros par an ^[106].

Certaines **molécules agissant sur d'autres canaux que CFTR** pourraient également avoir des effets bénéfiques pour la mucoviscidose. Ainsi, le Dénufosol (INS37217, Inspire Pharmaceuticals) et le Moli1901 (Lancovutide, Lantibio-AOP Orphan Pharmaceuticals AG) activent des canaux chlorure calcium-dépendants. Dans un premier essai, les patients traités par Dénufosol pendant 24 semaines avaient vu une amélioration de leurs capacités pulmonaires (volume maximal expiré en 1 seconde, ou FEV₁), mais ce bénéfice n'a malheureusement pas été retrouvé sur une plus grande cohorte, et à plus long terme ^[107-109]. Le Moli1901 a, quant à lui, donné des résultats suffisamment encourageants dans un essai clinique de phase II pour passer en phase III ^[110]. Des inhibiteurs du canal épithélial sodique ENaC sont également dans le *pipeline*, à l'image du GS-9411 (Gilead Science) pouvant permettre de retrouver une fluidité normale du mucus ^[111].

2. Thérapie génique : considérations physiologiques

Bien que de nombreux organes soient atteints par la maladie, l'insuffisance respiratoire est la principale cause de mortalité chez les patients mucoviscidosiques et le poumon demeure donc l'organe à traiter en priorité. Ainsi, la thérapie génique de la mucoviscidose consisterait à transférer le gène *CFTR* sauvage dans l'épithélium bronchique, afin de normaliser le transport des ions chlorure à la membrane et par conséquent améliorer, voire faire disparaître, les conséquences respiratoires. Afin de pouvoir cerner les diverses questions qui se posent, il est important de rappeler un certain nombre de considérations biologiques concernant l'organe et le tissu cible, en l'occurrence le poumon et l'épithélium respiratoire.

a) Structure et fonctions de l'appareil respiratoire

Le tractus respiratoire est composé du système respiratoire supérieur (oropharynx, nasopharynx, pharynx et structures associées) et du système respiratoire inférieur (larynx, trachée, bronches et poumons). Le rôle fondamental des voies respiratoires est de permettre l'échange gazeux entre l'air et le sang. Afin d'acheminer l'air riche en oxygène jusqu'aux alvéoles où va être effectué cet échange, les voies respiratoires, et plus particulièrement les voies respiratoires inférieures, ont une structure complexe. En effet, « l'arbre trachéobronchique » est une succession de subdivisions allant de la trachée jusqu'aux sacs alvéolaires. La trachée représente le tronc qui se divise tout d'abord en deux bronches principales qui s'enfoncent dans chaque poumon et qui se subdivisent elles-mêmes en bronches lobaires (trois pour le poumon droit et deux pour le poumon gauche). Chacune de ces bronches se divise ensuite en bronches segmentaires pour ensuite se subdiviser en bronchioles de calibre de plus en plus petit, jusqu'à aboutir aux bronchioles terminales et respiratoires. Ces dernières se divisent en conduits alvéolaires et donnent naissance aux sacs alvéolaires (constitués de plusieurs alvéoles pulmonaires) ([Figure 9](#)).

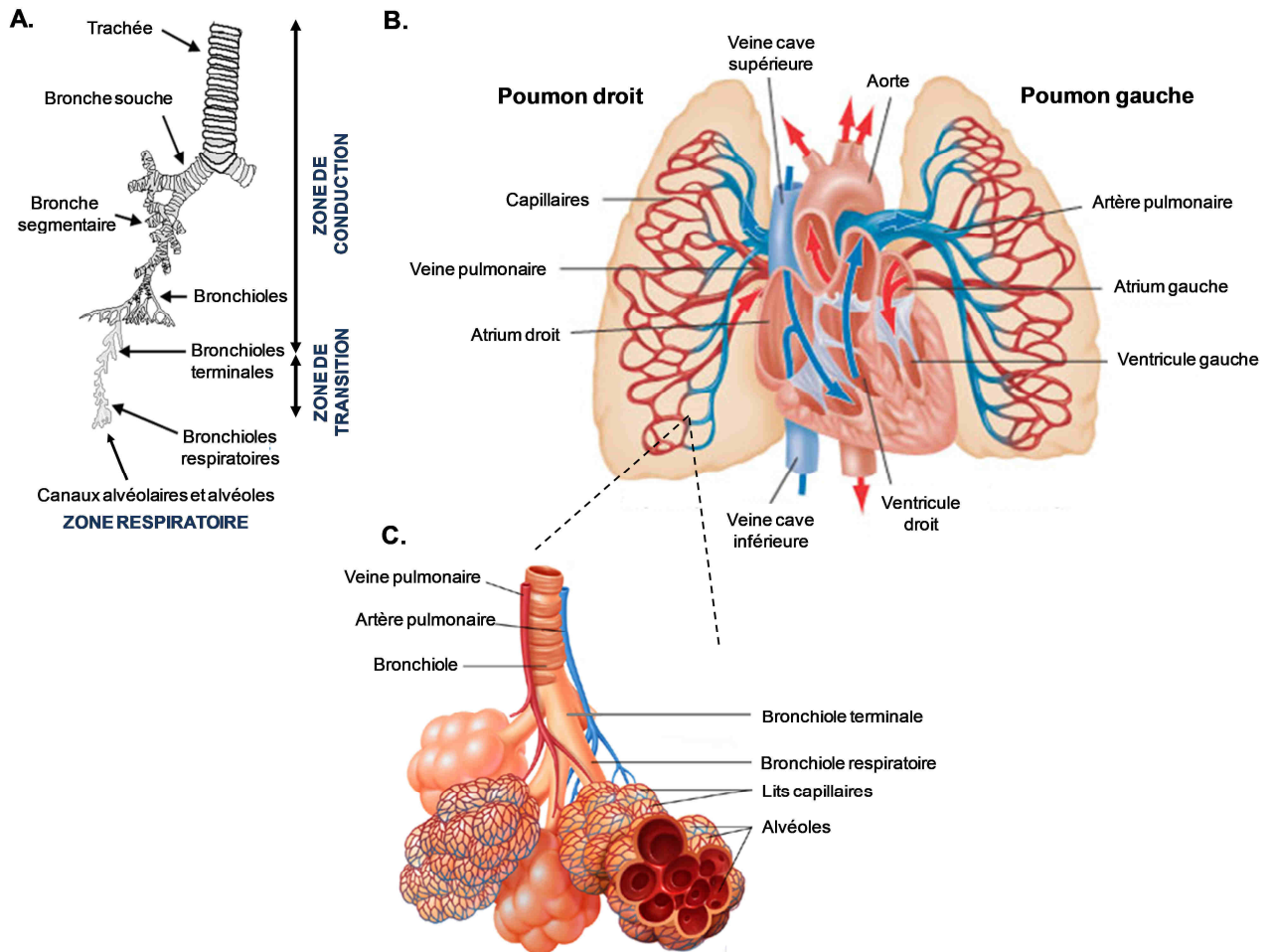


Figure 9 : Architecture des voies aériennes humaines (A) et illustration de la circulation pulmonaire (B)^a. Les alvéoles pulmonaires sont situées à l'extrémité des bronchioles, et permettent les échanges gazeux (C)^b.

Le diamètre des conduits diminue au fil des embranchements, allant d'environ 1,8 cm pour la trachée à environ 0,04 cm pour les conduits alvéolaires^[112]. D'un point de vue fonctionnel, les voies respiratoires sont divisées en plusieurs zones (Figure 9A), à savoir :

- la **zone de conduction** qui véhicule l'air mais ne participe pas à l'échange gazeux, et qui est constituée des voies aériennes supérieures et d'une partie des voies aériennes inférieures (de la trachée aux bronchioles terminales)
- la **zone de transition** (composée des bronchioles respiratoires)
- la **zone respiratoire** (des canaux alvéolaires jusqu'aux alvéoles pulmonaires, représentant une surface d'échange gazeux d'environ 140 m²)^[112].

^a Source : Pulmonary vascularisation, 2011. <http://www.hwcr.org/Health/Disease/Photos/Pulmonary%20circulation.jpg>

^b Source : www.virtualmedicalcentre.com

Ensuite, chaque segment pulmonaire se caractérise par la présence d'anneaux cartilagineux, régressant progressivement au niveau des bronches pour disparaître totalement au niveau des bronchioles. Inversement, la quantité de muscles lisses augmente à mesure que les conduits se rétrécissent, de façon à soutenir les structures plus profondes.

Le tractus respiratoire est vascularisé à travers la circulation systémique et la circulation pulmonaire. La circulation systémique permet l'apport de sang oxygéné (*via* les artères bronchiques) à la zone de conduction de l'arbre trachéobronchique, alors que la circulation pulmonaire permet l'apport des éléments nutritifs à la zone de transition et à la zone respiratoire. La circulation pulmonaire véhicule le sang veineux *via* l'artère pulmonaire, qui se subdivise en un lit capillaire entourant les alvéoles. Cette microcirculation permet ainsi les échanges gazeux et l'oxygénation du sang. Le sang oxygéné sera ensuite ramené au cœur gauche par les veines pulmonaires (Figure 9B et C) ^[113].

b) Composition de l'épithélium des voies respiratoires

Comme l'illustre la Figure 10, la composition de l'épithélium des voies respiratoires varie d'un segment à l'autre. Globalement, les voies aériennes, de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales, sont tapissées d'un épithélium cilié qui est lui-même recouvert d'un liquide de surface (Liquide de Surface des voies Aériennes, LSA). Ce dernier contient des protéines antimicrobiennes, de la lactoferrine, du lysozyme et des défensines, le tout en milieu aqueux. Des glandes s'invaginant à partir de l'épithélium dans la sous-muqueuse sont formées par des cellules séreuses et muqueuses.

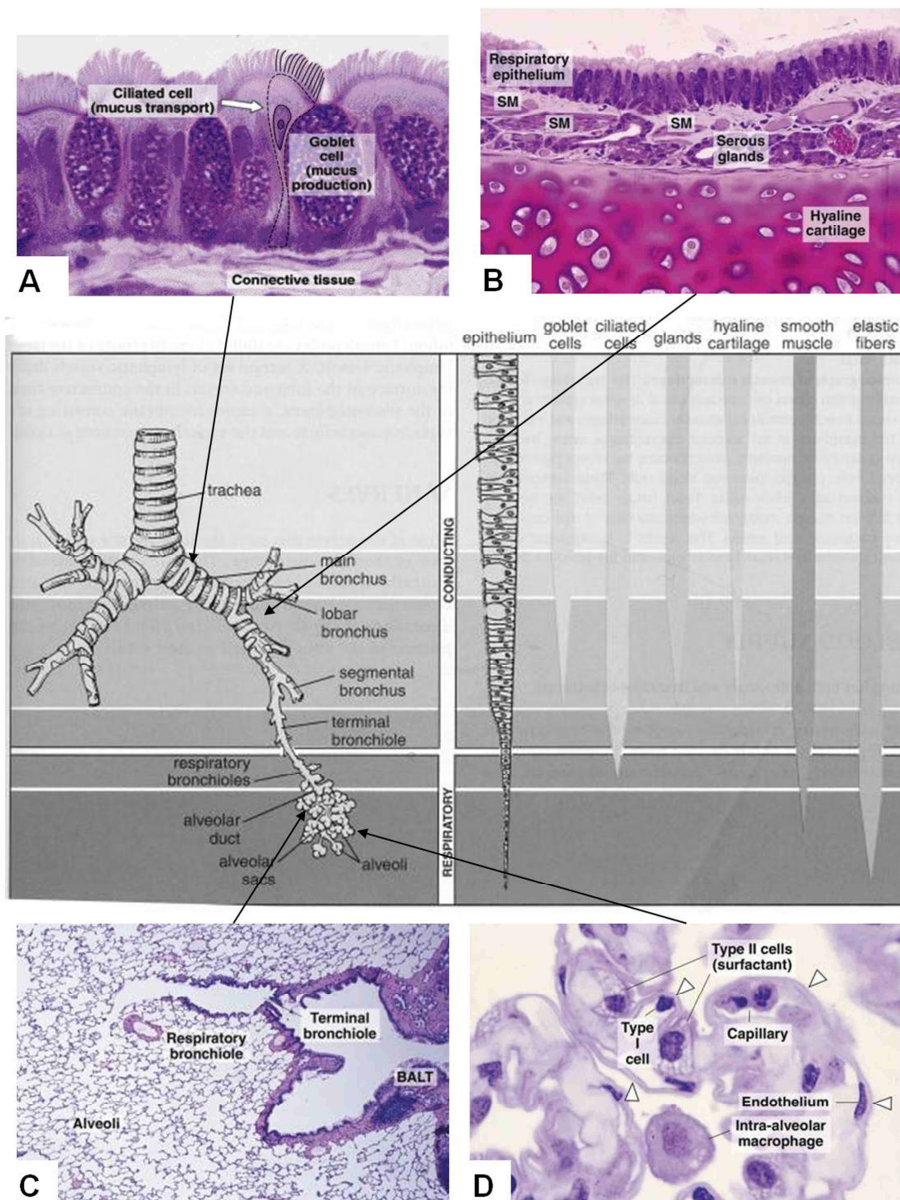


Figure 10 : Composition qualitative de l'épithélium de l'arbre trachéobronchique, illustrée par des coupes histologiques au niveau de la trachée (A), des bronches (B), des bronchioles terminales et respiratoires (C) et des alvéoles (D) ^a

^a Source : <http://www.mc.vanderbilt.edu/histology/labmanual2002/labsection2/Respiratory03.htm>

Au niveau de la trachée et des bronches, l'épithélium est formé de cellules ciliées, de cellules en gobelet et de cellules basales enfouies. Les cellules à gobelet (ou cellules calciformes ; Figure 10A) sécrètent le mucus (constitué principalement de glycoprotéines : les mucines), qui empêche la déshydratation de l'épithélium, l'accumulation des particules endogènes ou exogènes, ou encore l'adhésion et l'invasion de pathogènes^[114]. Ces cellules, localisées au niveau de la trachée et des bronches, sont remplacées par des cellules de Clara dans les structures plus profondes. Les cellules de Clara (de forme cuboïde dans les parties distales, et pyramidale dans les parties proximales) interviennent dans le métabolisme des xénobiotiques, dans la régulation locale de la réponse inflammatoire et immunitaire, ainsi que dans la régénération de l'épithélium bronchique^[115]. Elles participent également à la sécrétion, dans le fluide extracellulaire, de protéines du surfactant (apoprotéines A, B, et D), de protéases, de peptides antimicrobiens, de cytokines et chémokines, ainsi que de mucines^[116]. Contrairement aux cellules à gobelet, les cellules ciliées se retrouvent jusqu'aux bronchioles respiratoires^[113]. Le battement coordonné des cils présents à leur pôle apical permet d'évacuer progressivement le mucus vers le pharynx afin d'y être dégluti ou expectoré. Ce processus, connu sous le nom de « clairance mucociliaire », constitue l'un des systèmes de défense et d'élimination des particules inhalées. Le nombre de cellules ciliées et la fréquence des battements diminuent progressivement dans les zones plus profondes des poumons.

Au niveau des bronchioles terminales, l'épithélium est simple cuboïde non cilié et devient simple pavimenteux à partir des bronchioles terminales jusqu'aux alvéoles^[113]. Les parois des alvéoles pulmonaires comprennent deux types de cellules épithéliales alvéolaires, à savoir les pneumocytes de type I et de type II. Les pneumocytes de type I (de type simple pavimenteux) sont des cellules minces et étalées qui, malgré leur faible nombre, recouvrent près de 95 % de la surface alvéolaire. Elles sont rattachées les unes aux autres par des jonctions serrées qui servent de barrière partiellement étanche à la diffusion de fluides et molécules dans l'espace intra-alvéolaire. Étroitement accolées aux cellules endothéliales des vaisseaux capillaires, elles forment avec elles la barrière alvéolo-capillaire à travers laquelle s'effectuent les échanges gazeux respiratoires. Les pneumocytes de type II (de type cuboïde), bien que très nombreux (environ 95 % des cellules alvéolaires), ne recouvrent que 2 à 5 % de la surface alvéolaire. Ce sont des cellules dispersées, qui semblent majoritairement retrouvées à la jonction de deux

alvéoles, et qui sont responsables de la sécrétion et du recyclage du surfactant. Elles participent également (tout comme les pneumocytes de type I) au transport ionique ^[117].

Le **surfactant pulmonaire** tapisse la surface interne des alvéoles et 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 ^[113]. C'est un mélange complexe composé majoritairement de phospholipides (85 à 90 %), de protéines biologiquement actives (SP-A, SP-B, SP-C et SP-D ; 6 à 8 %) de lipides neutres (4 à 7 %, et principalement du cholestérol) et d'une faible fraction d'hydrates de carbone. Si une partie du surfactant est éliminé par clairance mucociliaire (2 à 5 %) et par les macrophages (10 à 15 %), la grande majorité est recyclée par les pneumocytes de type II en vue d'une utilisation ultérieure ^[118].

Comme évoqué précédemment, on retrouve également des **macrophages alvéolaires** associés à la paroi des alvéoles. Ils assurent la phagocytose des particules, microorganismes et autres débris inhalés et retrouvés dans l'espace alvéolaire. Lors de la phagocytose, les macrophages libèrent des enzymes et des médiateurs de l'inflammation. Ils constituent ainsi la deuxième ligne de défense du tractus respiratoire.

c) Cellules cibles de la thérapie génique et niveaux d'expression de *CFTR*

Des études antérieures ont montré qu'il n'était pas forcément nécessaire de restaurer une activité importante du gène *CFTR* pour obtenir un effet thérapeutique significatif. En effet, certaines personnes possédant des mutations rares n'expriment que 10 % de *CFTR* normale, sans pour autant présenter de complications pulmonaires ^[119]. Ensuite, il est à noter que la relation entre l'expression du gène *CFTR* et la correction du défaut de transport des ions chlorure n'est pas linéaire. Il est estimé que l'épithélium des voies respiratoires contient 1 à 2 copies d'ARNm *CFTR* par cellule, les quantités les plus importantes étant détectées dans les glandes séreuses et dans le conduit des glandes sous-muqueuses (au niveau de la zone de conduction) ^[120]. Des études d'hybridation *in situ* ont par ailleurs montré que seules 5 % des cellules au niveau des bronchioles et des régions alvéolaires possédaient de l'ARNm *CFTR* ^[121]. Ainsi, cette faible expression globale suggère que la plupart des cellules épithéliales pulmonaires requièrent le transfert du gène *CFTR* sauvage afin d'espérer corriger la canalopathie ^[122]. Il est actuellement estimé que l'expression de *CFTR* dans seulement 5 % à 20 % des cellules épithéliales pulmonaires adultes permettrait de corriger le défaut de

transport des ions chlorure ^[123–125]. Cependant, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que près de la totalité d'entre elles devraient exprimer *CFTR* afin que le défaut d'absorption des ions sodium par le canal ENaC soit corrigé ^[124,126,127]. En revanche, d'après des résultats obtenus sur le modèle furet *cftr*^{-/-}, un niveau de correction de l'ordre de 5 à 10 % au niveau de l'épithélium trachéal permettrait de restaurer le défaut d'éradication des bactéries^a.

Partant de la constatation que la dysfonction du CFTR n'entraînait pas de conséquences respiratoires chez la souris, et du principe selon lequel la réduction du liquide de surface des voies aériennes était en partie liée à l'absence de régulation du canal ENaC, une équipe allemande a créé des souris transgéniques surexprimant ENaC au niveau de l'épithélium bronchique (en utilisant un promoteur des cellules de Clara). La surexpression de la sous-unité β (*Scnn1b*) du canal sodique conduit à la formation d'un mucus hypervisqueux à l'origine de lésions pulmonaires caractéristiques proches de la mucoviscidose, s'accompagnant d'une inflammation bronchique précoce et d'une réduction de la capacité à éliminer les pathogènes (Figure 11) ^[128]. Au-delà d'être un modèle animal très utile pour étudier les conséquences respiratoires de la mucoviscidose et tester les produits de thérapie génique dans des conditions de viscosités plus proches de la réalité, ce modèle a ouvert un nouvel horizon sur le plan thérapeutique, ciblant le défaut de régulation des flux de Na⁺ trans-épithéliaux dans le but de rétablir une fluidité normale du mucus.

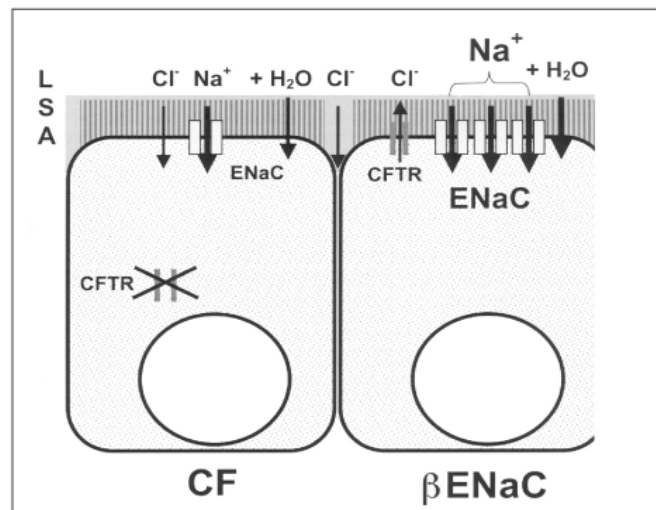


Figure 11 : Analogies entre les liquides de surface des épithéliums bronchique CF humains et β ENaC murins. La surexpression de la sous-unité β du récepteur ENaC dans les cellules épithéliales respiratoires entraîne une augmentation du flux trans-épithélial d'ions Na⁺ accompagnée d'eau. En conséquence, l'épaisseur du LSA est fortement réduite, ce qui limite le transport mucociliaire. Cette anomalie est analogue à celle retrouvée au niveau de l'épithélium bronchique de sujets mucoviscidosiques ^[128].

^a Communication orale, N.W. Keiser, *CFTR gene correction of only the surface airway epithelium restores antimicrobial activity to cftr knockout ferret tracheas ex vivo*. 15^{ème} congrès de la société américaine de thérapie génique et cellulaire (ASGCT) ; Philadelphie, mai 2012

Chapitre II: LA THERAPIE GENIQUE

La thérapie génique est un vaste domaine de recherche, porteur d'espoir pour un grand nombre de maladies. Si les outils et les approches envisagés doivent être adaptés à la pathologie ciblée, les découvertes et améliorations technologiques apportées aux agents de transfert de gènes permettent sans cesse d'élargir leurs champs d'applications. C'est pourquoi il est important d'avoir une vue d'ensemble des moyens actuels de la thérapie génique et leurs champs d'applications à l'heure actuelle.

I Problématique de la thérapie génique somatique ou germinale

La thérapie génique peut être appliquée sur les cellules somatiques et les cellules germinales avec des conséquences différentes. Sur les cellules somatiques, elle apporte une correction phénotypique à un groupe cellulaire déterminé et à leurs cellules-filles, sans affecter le patrimoine génétique constitutionnel de l'individu traité. En revanche, sur les cellules germinales ou dans un embryon au stade précoce, il y a modification du patrimoine génétique de l'individu, qui se transmettra irrémédiablement à sa descendance. Dans l'immense majorité des cas, en plus de présenter des risques médicaux importants, cette seconde application n'aurait pas d'indication thérapeutique chez l'Homme. Dans le cas d'un couple risquant de donner naissance à un enfant touché par une maladie génétique, il faudrait commencer par faire un diagnostic préimplantatoire des embryons, afin de détecter ceux porteurs de l'anomalie génétique. Ce diagnostic conduirait évidemment à écarter les embryons « malades », et à ne transférer dans l'utérus maternel que les embryons sains. Par conséquent, la thérapie génique germinale s'apparente plus à une « amélioration génétique » qu'au traitement effectif de pathologies. Pour toutes ces raisons éthiques, morales et scientifiques, la thérapie génique germinale n'est pas autorisée par la loi.

En revanche, la thérapie génique *in utero* apparaît envisageable, et d'un réel intérêt thérapeutique, notamment pour des maladies comme la mucoviscidose où l'épithélium respiratoire doit être traité précocement. Des études ont d'ailleurs montré que le transfert *in utero* du gène *CFTR* à l'aide d'un adénovirus injecté dans le liquide amniotique permettait d'augmenter de façon importante la survie de souris modèles, même en l'absence d'expression soutenue du transgène^[129]. Bien que ces résultats aient été infirmés depuis^[130], le transfert de gènes *in utero* à destination de l'épithélium pulmonaire continue d'être activement exploré^[131-135].

II Stratégies et approches de thérapie génique

En fonction du type de maladie, de sa physiopathologie ainsi que de l'organe/tissu cible, il existe à l'heure actuelle deux grandes stratégies de thérapie génique, qui peuvent se conjuguer avec différentes approches. Les deux stratégies concernent l'administration des gènes (Figure 12).

Largement décrite dans la partie introductive de ce manuscrit, la **thérapie génique *ex vivo*** consiste à prélever les cellules du patient, à les modifier en y apportant le gène d'intérêt thérapeutique, puis à les lui réimplanter (après amplification) afin que celles-ci se développent et remplacent peu à peu les cellules malades. Cette stratégie fut la première mise en œuvre chez l'Homme, et reste particulièrement attractive concernant les cancers hématopoïétiques, en raison de l'accessibilité des cellules souches sanguines (voir page 4).

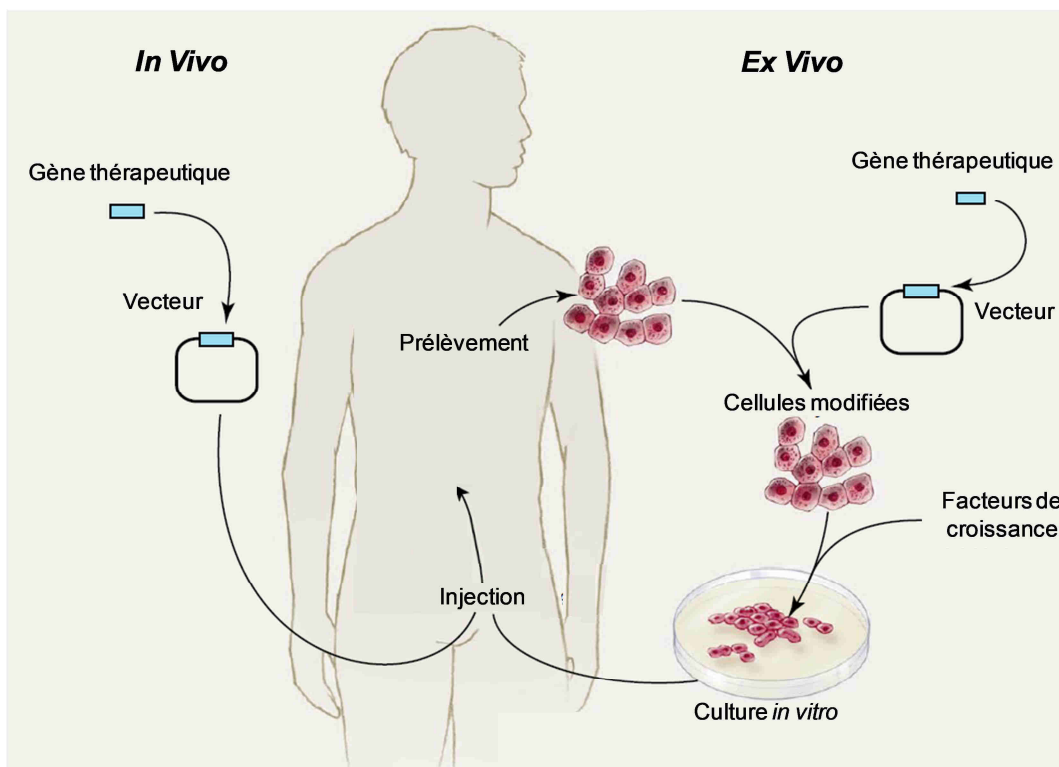


Figure 12 : Modes d'administration de gènes à visée thérapeutique (modifiée d'après ^[136]). Approche *ex vivo* : les cellules déficientes (ou leurs progéniteurs) sont prélevées, puis modifiées par introduction du transgène et multipliées, avant d'être réimplantées chez le patient afin de s'y développer et de remplacer peu à peu les cellules déficientes. Approche *in vivo* : le gène thérapeutique (couplé ou non à un vecteur) est administré directement chez le patient par injection locale ou intraveineuse

La thérapie génique *ex vivo* de la mucoviscidose n'en est qu'à ses débuts. Si la preuve de principe d'une différenciation des cellules souches en cellules épithéliales pulmonaires (lorsqu'elles sont administrées par voie intratrachéale) a été établie chez l'animal, le pourcentage de cellules épithéliales provenant de la différenciation des cellules greffées demeure faible (<0,01 – 0,025 %) ^[131,137–141]. Certains groupes ont également essayé de greffer des cellules souches (modifiées ou non *ex vivo*) afin de restaurer une activité CFTR suffisante chez des animaux modèles *cfr*^{-/-}. A nouveau, le pourcentage de cellules épithéliales provenant de la greffe fut restreint, et l'activité du canal chlorure par conséquent très limitée ^[142–144]. Ainsi, lorsque le poumon est la cible, la **thérapie génique dite *in vivo*** reste encore davantage envisagée.

Cette seconde stratégie consiste en l'administration directe du gène thérapeutique chez le patient, par délivrance locale ou intraveineuse. D'une manière générale, la quantité de matériel nécessaire (vecteur et/ou ADN) est souvent plus importante que celle requise pour la stratégie *ex vivo* car la cible peut être vaste et/ou difficile d'accès. De plus, plusieurs administrations du produit de thérapie génique peuvent être nécessaires pour obtenir, ou maintenir, l'effet thérapeutique escompté. Ce type de protocole présente l'avantage de ne pas obligatoirement nécessiter d'intervention chirurgicale, mais exige de choisir un vecteur efficace, ainsi que la voie d'administration la plus adaptée.

En fonction de l'effet escompté, différentes approches de thérapie génique ont été envisagées, les principales étant schématisées sur la [Figure 13](#).

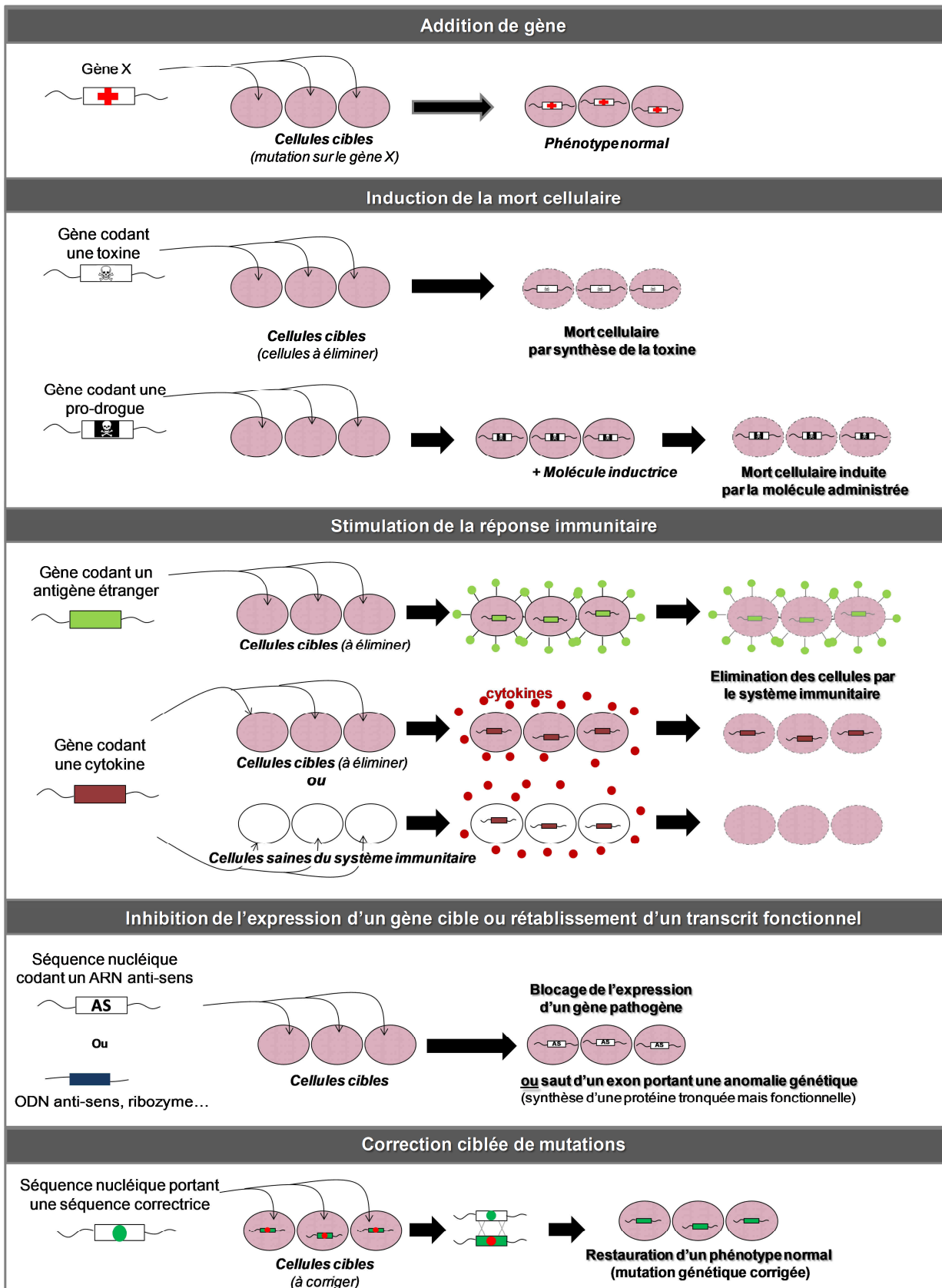


Figure 13 : Quelques approches majeures de thérapie génique

- **L'addition de gène**, envisagée dès les débuts de la thérapie génique comme traitement pour les maladies monogéniques, continue d'être l'approche dominante pour une majorité d'entre elles. Il s'agit d'apporter dans la cellule cible une "copie" saine du gène dont la mutation est responsable de la pathologie. En pratique, on a le plus souvent recourt à un vecteur (viral ou non viral) pour apporter dans les cellules du sujet une séquence d'ADN homologue de la séquence normale du gène d'intérêt (ADN complémentaire, ADNc).

Lorsqu'on cible des pathologies tumorales ou infectieuses, où l'effet recherché est d'induire la **mort cellulaire**, on peut également envisager l'apport d'une copie d'un gène codant une protéine toxique pour la cellule, ou le transfert d'un gène portant la cassette d'expression d'une enzyme (ex : HSV/TK) qui, en présence d'une molécule inductrice comme le Ganciclovir, va aboutir à la mort des cellules modifiées et des cellules adjacentes (par effet *by-stander*). Comme cela a été évoqué dans la partie introductive (page 4), l'apport de certains gènes peut également permettre de **stimuler le système immunitaire** afin qu'il identifie les cellules cibles comme du non-soi, et procède à leur élimination.

- **La correction ciblée** d'un gène muté est une approche très récente faisant le plus souvent appel à des enzymes de restriction artificielles créées par la fusion d'un domaine de liaison à l'ADN (de type « doigt de zinc », [Figure 14A](#)), et d'un domaine catalytique de coupure de l'ADN (endonucléase Fok I) ([Figure 14B](#)). Ces enzymes sont ainsi appelées « nucléases à doigts de zinc » (*Zinc-Finger Nucleases*, ZFNs). En fonction de la nature des acides aminés qui composent chaque doigt de zinc (hors les cystéines et histidines liant l'atome de zinc), une séquence spécifique de trois nucléotides est reconnue. En utilisant deux protéines comportant chacune trois doigts de zinc choisis, la reconnaissance s'effectue ainsi sur une séquence spécifique de dix-huit nucléotides, censée être unique dans le génome ([Figure 14B](#)). Le rapprochement des domaines endonucléasiques de Fok I va permettre leur dimérisation et la coupure de l'ADN. Si on effectue de cette manière, une coupure au niveau d'une mutation précise, l'apport d'une courte séquence d'ADN non mutée permet, par simple recombinaison homologue, de remplacer la portion équivalente du gène muté. Cette méthode a récemment permis de restaurer une hématopoïèse normale sur un modèle de souris hémophiles, la nouvelle information génétique étant transmise aux cellules-filles lors des divisions cellulaires ^[145].

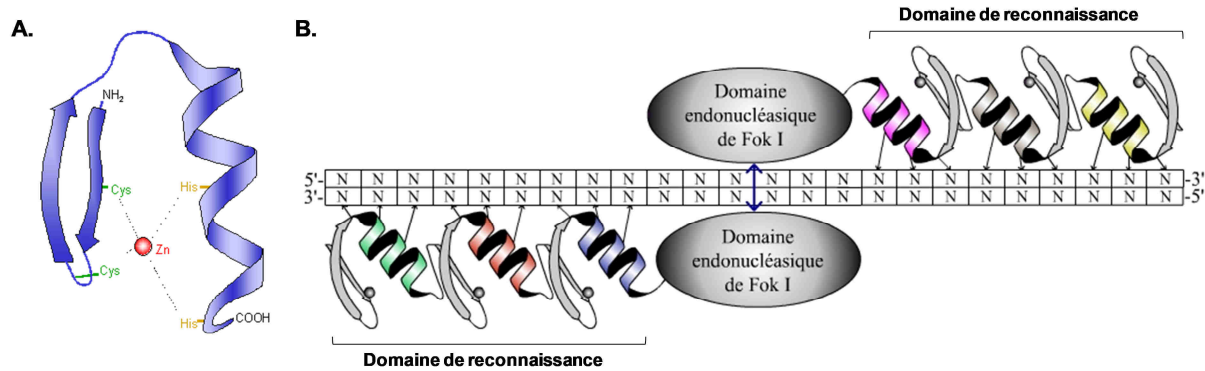


Figure 14 : (A) Structure en doigt de zinc ^a. Un atome de zinc central stabilise le repliement de la protéine en établissant quatre liaisons avec deux résidus histidine et deux résidus cystéine. On trouve également des structures en doigt de zinc faisant intervenir quatre résidus cystéine. (B) Coupure de l'ADN après dimérisation du domaine nucléasique de Fok I ^b. Les deux domaines de reconnaissance, composés chacun de trois doigts de zinc, permettent de reconnaître spécifiquement une séquence de 18 nucléotides (quatre ZFNs peuvent être associées pour augmenter la spécificité). A chaque domaine de reconnaissance est couplé le domaine endonucléasique de l'enzyme Fok I.

D'autres techniques apparentées sont actuellement en cours de perfectionnement. On peut citer les très récentes TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) qui réalisent également, à l'instar des ZFNs, des coupures ciblées de l'ADN double brin, permettant ensuite une « édition du génome » par recombinaison homologue ^[146]. Si la recombinaison homologue (largement utilisée dans l'inactivation de gènes chez l'animal, plus connue sous le nom de *knock-out*) ne nécessite pas en soi de coupure préalable de l'ADN, son efficacité demeure très faible dans ces conditions. Cependant, un HDAdV (*Helper-Dependent Adenoviral Vector*) a récemment permis d'augmenter ce rendement sur des cellules souches *ex vivo*, et ainsi d'éviter une cassure préalable de l'ADN génomique ^[147].

^a Source : <http://www.wikipedia.fr> (article « Zinc finger »)

^b Source : http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/therapie_genique/therapie_genique.htm

Le trans-épissage de l'ARN par spliceosome (*Spliceosome-Mediated RNA Trans-splicing*, SMART), permettant de « réparer » une mutation au niveau de l'ARNm au cours de l'épissage, est également une technique de correction ciblée (Figure 15). Elle a notamment été employée pour essayer de réparer la mutation $\Delta F508$ dans la mucoviscidose [148,149].

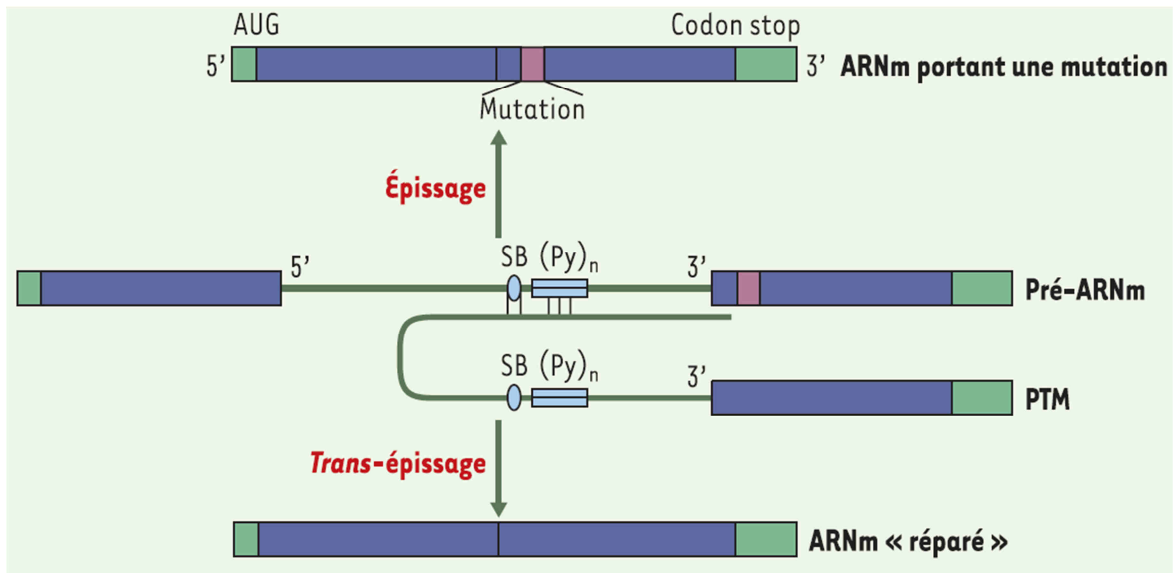


Figure 15 : Mécanisme de trans-épissage [150]. Dans cet exemple, le pré-ARNm comprend deux exons, et porte une mutation (représentée en violet) dans le 2^{ème} exon, conduisant à une protéine non fonctionnelle. L'utilisation de PTM (*Pre-Trans-splicing Molecule*) permet la suppression de la mutation en remplaçant l'exon muté. Le PTM se lie au pré-ARNm par appariement de séquences, ce qui masque en partie le site 3' d'épissage. La réaction d'épissage normale est donc bloquée et le domaine de trans-épissage du PTM peut jouer le rôle d'un site 3' d'épissage. Le PTM apporte l'exon dépourvu de mutation, ce qui permet la réparation de l'ARNm et la production d'une protéine fonctionnelle. (Py)_n : étendue de polypyrimidines, SB : site de branchement.

Une limitation majeure concernant ces approches ciblées reste l'important degré de dégénérescence de l'ADN qui peut entraver la reconnaissance systématique des séquences cibles.

- **La mise en silence ciblée** d'un gène muté (ou « silençage génique ») peut être envisagée lorsque son produit est toxique ou s'accumule dans les tissus. Elle fait appel aux thérapies « anti-sens », utilisant les ARN interférents (ARNi) qui agissent au niveau post-transcriptionnel, en catalysant la dégradation des ARN messagers [151]. Ainsi, à l'inverse de l'ADN, les ARNi agissent au niveau du cytoplasme ce qui permet d'éviter les étapes d'import nucléaire et de transcription [152].

Les siRNAs (*small interfering RNAs*), de petits ARN doubles brins de 21 à 24 nucléotides, ont été particulièrement étudiés durant la dernière décennie, principalement dans le but d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses. Ces petits ARNi, à l'état de double brin, sont reconnus dans le cytoplasme de la cellule cible par un complexe protéique nommé RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), qui libère alors le brin complémentaire du brin sens (Figure 16). Ce complexe activé va reconnaître le transcrite cible par simple complémentarité de bases, les acides nucléiques appariés étant alors clivés par une nucléase faisant partie du complexe RISC.

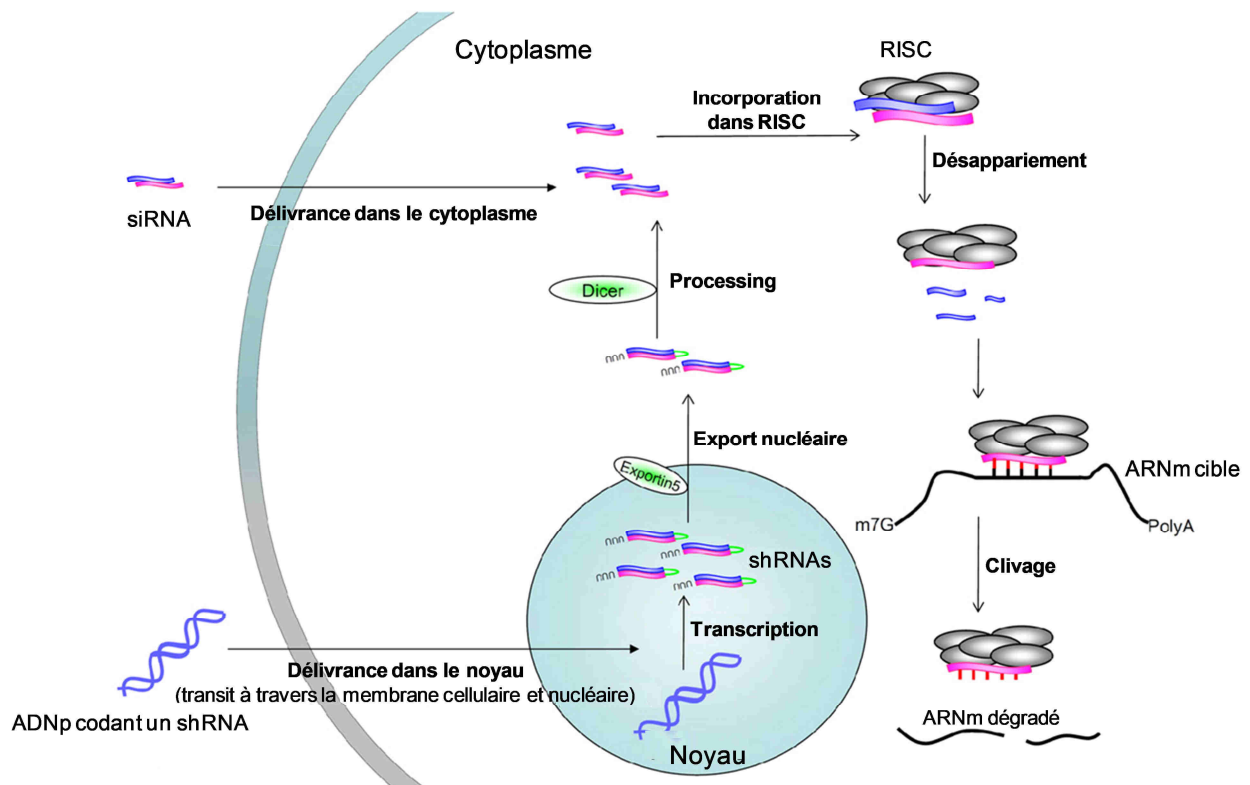


Figure 16 : Schéma simplifié du silençage génique à l'aide d'un siRNA ou d'un plasmide codant un shRNA (modifié d'après ^[153])

Si la première preuve de concept du silençage génique a été récemment établie chez l'Homme (après administration systémique de siRNAs couplés à un vecteur non viral) ^[154], le principal inconvénient de cette approche repose sur la nécessité d'utiliser des doses de matériel génétique très importantes (plusieurs mg par kg chez l'homme). C'est pourquoi les shRNAs (*small hairpin RNAs*), des siRNAs reliés par une boucle de quelques nucléotides issus de la transcription de plasmides ayant atteint le noyau cellulaire, sont étudiés dans le but de limiter la quantité de matériel génétique apportée aux cellules (celles-ci produisant alors les ARN d'intérêts par la machinerie cellulaire ; Figure 16) ^[155].

L'utilisation de courtes séquences d'ARN anti-sens peut également être utilisée afin de masquer certains sites d'épissage, de façon à **sauter un ou plusieurs exons** (dont celui comportant une erreur) lors de l'étape d'épissage, et permettre ainsi à la cellule de synthétiser une protéine tronquée, mais néanmoins suffisamment fonctionnelle. Cette technique, appelée « saut d'exons thérapeutique » (ou *exon skipping*), est particulièrement prometteuse en ce qui concerne les myopathies de Duchenne et de Becker (voir page 53).

III La thérapie génique actuelle en quelques chiffres

1. Les catégories de maladies visées

Au début de l'année 2012, pas moins de 1 786 essais cliniques de thérapie génique étaient en cours, ou approuvés au niveau international (Figure 17).

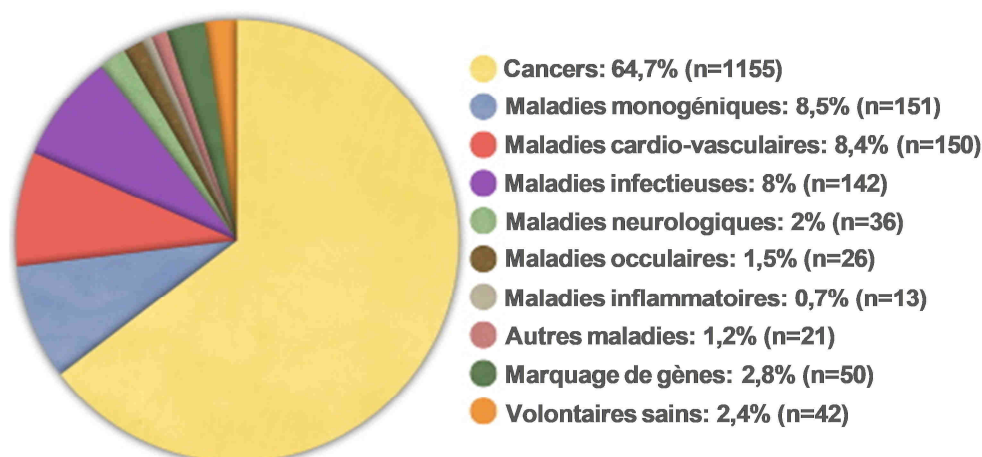


Figure 17 : Répartition des essais cliniques (n) de thérapie génique en fonction de la nature de la pathologie^a

La grande majorité des essais actuels concernent le traitement des tumeurs malignes (pulmonaires, gynécologiques, neurologiques, de la peau, gastro-intestinales, pédiatriques, et hémopathies malignes). La principale raison est que les besoins sont grands et que les patients pouvant être inclus dans les essais sont nombreux. De plus, dans le cas du cancer, on espère pouvoir se contenter d'une expression transitoire du transgène (surtout si la mort cellulaire est recherchée), alors qu'il est préférable d'obtenir une expression persistante pour les

^a Source : The Journal of Gene Medicine, janvier 2012 (<http://www.abedia.com/wiley/indications.php>)

maladies génétiques. Dans cette grande thématique, de nombreuses stratégies ont été envisagées telles que l'immunothérapie, le transfert de gènes suppresseurs de tumeurs ou le transfert d'un gène rendant les cellules tumorales sensibles à une drogue.

Les essais cliniques concernant les maladies monogéniques représentent quant à eux 8,5 % des essais actuels, les principales autres pathologies ciblées étant les maladies cardiovasculaires et infectieuses, là aussi en raison du marché de masse qu'elles représentent. A l'heure actuelle, un seul médicament de thérapie génique est sur le marché. Il s'agit d'un adénovirus portant le gène suppresseur de tumeur p53 homologué en Chine et dans les Philippines sous le nom de Gendicine pour traiter les cellules squameuses cancéreuses de la tête et du cou. Les essais cliniques effectués restent néanmoins flous.

En revanche, l'Agence européenne du médicament vient, pour la première fois, de recommander l'utilisation d'un traitement par thérapie génique du déficit en lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme nécessaire au métabolisme des graisses^a. Cette décision fait suite à un récent article, montrant que le « médicament » Glybera[®] (un vecteur AAV portant le gène *LPL* injecté par voie intramusculaire) était bien toléré chez l'homme et conduisait à une importante diminution des triglycérides^[156]. La mise sur le marché de ce produit serait le symbole d'un important pas en avant concernant l'utilisation de la thérapie génique en clinique.

2. Les techniques utilisées dans les essais cliniques

Une fois le gène sélectionné pour son potentiel thérapeutique face à une pathologie donnée, une étape cruciale de la thérapie génique est de faire pénétrer la nouvelle information génétique dans l'organisme du patient. On qualifie de vecteur, tout système permettant le transfert des acides nucléiques d'intérêt dans une cellule donnée. La vectorologie est donc le domaine d'étude et de développement des outils de transfert de l'information génétique. Les techniques de vectorisation qui ont été développées au cours de ces deux dernières décennies peuvent être divisées en deux grandes catégories, à savoir les vecteurs viraux et non viraux.

Parmi les stratégies non virales, on peut distinguer celles basées sur des techniques physiques, celles utilisant des molécules non chargées et celles utilisant des composés cationiques. Les

^a Communiqué de presse de l'Agence Européenne du Médicament (EMA). *Positive opinion on the marketing authorisation of Glybera (alipogene tiparvovec)*; 20 juillet 2012.

principaux vecteurs utilisés en thérapie génique sont d'origine virale, majoritairement les adénovirus et les rétrovirus (Figure 18). Les lipides sont quant à eux utilisés dans 6 % des essais cliniques actuels.

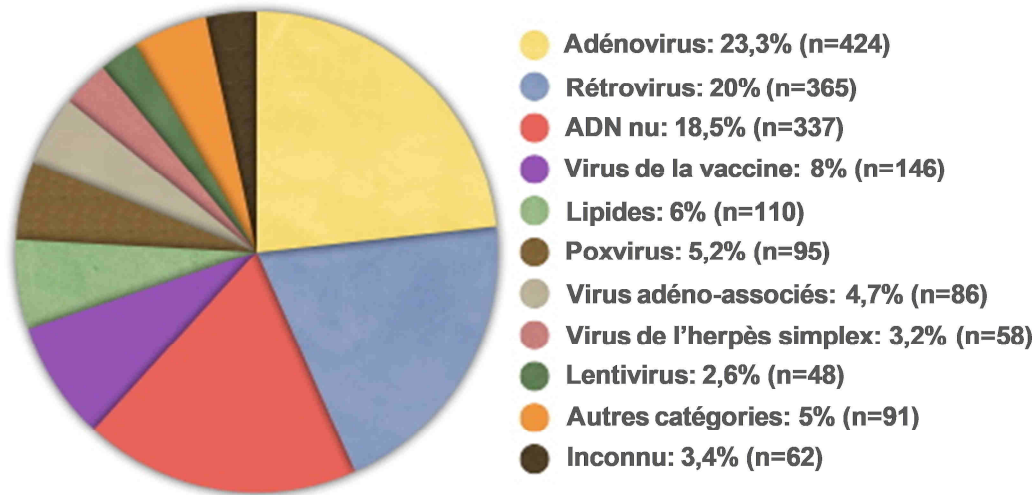


Figure 18 : Répartition des vecteurs utilisés dans les essais cliniques (n) de thérapie génique^a

IV Les techniques de transfert de gènes

1. Les vecteurs viraux

Les virus sont des vecteurs naturels puisque leur propriété essentielle est d'accéder au noyau des cellules hôtes, d'y transférer leur matériel génétique (ADN ou ARN) et d'exploiter la machinerie cellulaire afin de se répliquer et se disséminer dans l'organisme. C'est pourquoi les premiers espoirs de thérapie génique furent liés à la compréhension de leur mécanisme d'action et leur première utilisation comme véhicule de gènes^[11]. Le principe consiste à amputer certaines séquences du virus qui codent les protéines indispensables au cycle infectieux pathogène, et n'y laisser que les séquences permettant de construire la particule virale et d'assurer le cycle d'infection. On parle alors de virus « sécurisé ». Le génome du virus est enfin modifié pour porter le gène thérapeutique (l'ADNc du gène *CFTR* dans le cas de la mucoviscidose). Les protéines virales qui pourraient potentiellement manquer à la formation des particules virales thérapeutiques sont fournies par des cellules dites productrices, ou « d'encapsidation », pendant la phase *in vitro* de production des vecteurs. Aujourd'hui, si

^a Source : The Journal of Gene Medicine, janvier 2012 (<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>)

approximativement deux tiers des essais cliniques utilisent un vecteur viral, il n'en demeure pas moins que cette approche présente souvent des inconvénients comme la taille limitée du transgène, la difficulté de production en masse (coût, variabilité dans les lots produits), tout comme des risques liés aux réactions immunogènes et inflammatoires induites chez l'hôte ou à une intégration non contrôlée de l'ADN viral dans le génome du patient (voir page 4).

Différents types de virus sont utilisés. Parmi eux, citons ici les vecteurs dérivés des adénovirus, des virus associés aux adénovirus (AAV), des virus de l'herpès, et des rétrovirus (parmi lesquels les lentivirus).

a) Les rétrovirus

Les rétrovirus sont des virus enveloppés, de 110 à 125 nm de diamètre. Ils possèdent un patrimoine génétique sous forme d'un double brin d'ARN, rétrotranscrit en ADN lors du cycle d'infection^[157]. Ces virus sont impliqués dans de graves pathologies humaines telles que les leucémies ou le SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise). C'est pourquoi les rétrovirus recombinants utilisés comme vecteurs (le plus souvent issus de virus murins) sont modifiés de façon à conserver les séquences LTRs (*Long Terminal Repeats*) nécessaires à leur intégration dans les chromosomes de la cellule hôte, ainsi que la séquence Ψ permettant l'encapsidation, mais sont en revanche dépourvus des séquences *gag*, *pol* et *env* nécessaires à la réplication. Le nouveau gène se transmet alors de cellule mère en cellule fille de manière égale, sans « dilution » de l'information génétique dans le temps. Cependant, de nombreux inconvénients restent liés à leur utilisation. Parmi eux, nous pouvons citer la relativement faible capacité d'incorporation d'un exogène (8 kb) et le manque de spécificité cellulaire. En effet, les protéines de l'enveloppe sont capables de se lier à de nombreux récepteurs à la surface de différents types cellulaires. De plus, l'intégration aléatoire de leur génome peut conduire à l'activation d'oncogènes conduisant à la défaillance du cycle cellulaire, comme ce fut le cas des « bébés bulles » ayant développé une leucémie^[15]. Enfin, la plupart de ces virus n'infectent que les cellules en division, ce qui compromet fortement leur utilisation, étant donné que les cellules cibles en thérapie géniques sont souvent des cellules qui ne se divisent pas ou peu (cellules souches sanguines, cellules musculaires, neurones, cellules du foie, cellules de l'épithélium pulmonaire, ...). En raison de ces limites, l'utilisation des vecteurs rétroviraux traditionnels est restée jusqu'ici restreinte au transfert de gènes *ex vivo*.

En revanche, les lentivirus (dont fait parti le VIH), une sous-famille des rétrovirus, sont capables une fois dans le cytoplasme des cellules infectées d'accéder au noyau en l'absence de rupture de la membrane nucléaire^[158]. A l'inverse des rétrovirus « classiques », l'accomplissement du cycle infectieux des lentivirus ne nécessite donc pas nécessairement de mitose. La mise en évidence de ces propriétés a permis d'envisager une multitude de nouvelles cibles thérapeutiques telles que les cellules du système nerveux central, les cellules rétinienne, hépatiques et cellules souches hématopoïétiques humaines. De plus, le pseudotypage des lentivirus, c'est-à-dire l'incorporation d'une enveloppe hétérologue par la particule virale lui conférant le tropisme de cette dernière, multiplie encore les possibilités de ciblage de ce type de vecteur.

Les lentivirus recombinants sont donc des outils porteurs d'espoir pour le traitement génétique d'un large éventail de maladies héréditaires acquises, dont la mucoviscidose^[158]. Pour cette maladie, la stratégie actuelle consiste à utiliser des vecteurs lentiviraux pseudotypés par des protéines d'enveloppe capables d'interagir avec la surface apicale des cellules épithéliales respiratoires^[159,160]. Grâce à cette technique, des chercheurs ont montré qu'il était possible d'obtenir une expression stable de *CFTR* au niveau de l'épithélium nasal (considéré comme représentatif de l'épithélium respiratoire) de souris déficientes pour le gène *CFTR*, permettant de corriger le défaut électrophysiologique pendant plus de 12 mois^[161,162].

Le consortium britannique de thérapie génique de la mucoviscidose (*UK CF Gene Therapy Consortium*) a également obtenu des résultats particulièrement encourageants avec des lentivirus dérivés du SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*), enveloppés avec les protéines F/NH du virus de Sendai, un virus extrêmement efficace pour infecter les cellules épithéliales respiratoires de manière transitoire^[163]. Ces vecteurs SIV pseudotypés se sont montrés efficaces (au moins 5 % de cellules ciliées transduites chez la souris *in vivo*) et ont un effet à très long terme (expression d'un gène rapporteur au niveau de l'épithélium respiratoire durant toute la durée de vie de la souris)^[164,165]. On ne sait toujours pas si ces longues durées d'expression sont dues à une intégration de l'ADN viral dans le génome des cellules souches/progénitrices pulmonaires, ou simplement à une demi-vie des cellules épithéliales respiratoires plus longue que celle référencée (jusqu'à 17 mois selon des études récentes^[166]). De plus, ces vecteurs restent efficaces lors d'administrations successives, sans que l'on sache

clairement pourquoi sur le plan immunologique^[167]. Les vecteurs lentiviraux semblent donc prometteurs, mais il reste cependant des obstacles importants à surmonter, notamment des problèmes de production à très grande échelle et une question de sécurité d'emploi de tels vecteurs intégratifs.

b) Les adénovirus

Les adénovirus sont des virus nus à ADN double brin de 36 à 40 kb, d'environ 90 à 100 nm de diamètre, capables d'entrer dans les cellules par endocytose grâce à des récepteurs cellulaires spécifiques. Aujourd'hui, plus de 50 sérotypes humains ont été mis en évidence dont la plupart sont des pathogènes respiratoires mineurs. Ce tropisme naturel pour l'appareil respiratoire fit de ce type de vecteurs un bon candidat pour la thérapie génique de la mucoviscidose. Capables de transporter de relativement grands fragments d'ADN (jusqu'à 30 kb) dans les cellules quiescentes et en division, ces vecteurs transfèrent leur ADN de façon épisomale, éliminant ainsi tout risque de mutagenèse insertionnelle.

Malgré des résultats précliniques encourageants sur les épithéliums nasal et pulmonaire d'animaux modèles^[168,169], ainsi qu'une bonne tolérance chez l'homme à des doses faibles à intermédiaires^[170], le transfert de gènes à l'aide d'adénovirus n'a pas tenu ses promesses chez les patients mucoviscidosiques^[171]. Ceci est grande partie dû à l'absence de récepteurs CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor*) à la surface apicale de la plupart des cellules épithéliales pulmonaires humaines^[172]. Au total, une dizaine de protocoles cliniques de thérapie génique de la mucoviscidose à l'aide d'adénovirus a ainsi été effectuée depuis 1993. Ces essais ont globalement montré que : (1) l'expression du transgène *CFTR* était détectable sur le plan moléculaire (mRNA, protéine CFTR), (2) une correction partielle du transport des ions chlorure était parfois détectable par mesure de la différence de potentiel (DDP) nasale, (3) la réaction inflammatoire pulmonaire était dose-dépendante, et (4) l'efficacité diminuait lors des réadministrations^[170,173]. Néanmoins, de nouvelles générations de vecteurs adénoviraux ont été développés et continuent d'être étudiés pour la mucoviscidose, tels que des vecteurs délétés de certaines séquences virales dans le but de limiter la réponse immunitaire, ou encore des vecteurs ciblant d'autres récepteurs que CAR.

c) Les virus adéno-associés

Les virus adéno-associés (AAVs) appartiennent à la famille des parvovirus, et sont de petits virus (20 à 25 nm de diamètre) à ADN simple brin de 4,7 kb, non pathogènes pour l'homme, qui furent découverts en tant que contaminants d'adénovirus en 1966^[174]. A l'heure actuelle, 12 sérotypes d'AAV sont connus chez l'homme, mais c'est le sérotype 2 (AAV2) qui est le plus connu sur le plan moléculaire et virologique. Son génome est constitué de deux séquences terminales inversées-répétées (ITRs) de 145 nucléotides, ainsi que de deux gènes. Ces derniers utilisent différents sites d'initiation de la traduction ainsi que l'épissage alternatif pour coder plusieurs protéines : le gène *rep* code quatre protéines impliquées dans le cycle viral (Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40), et le gène *cap* code trois protéines de structure (VP1, VP2 et VP3) nécessaires à l'encapsidation du génome viral (Figure 19)^[175].

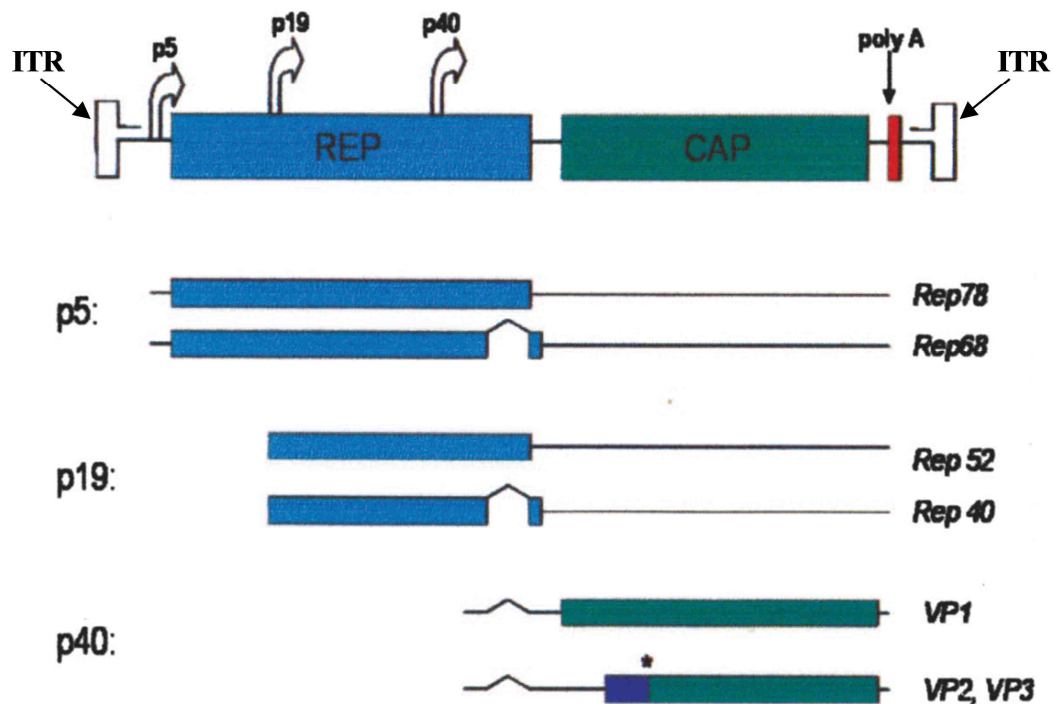


Figure 19 : Carte du génome de l'AAV2 sauvage (modifiée d'après^[176]). Les gènes *rep* et *cap* sont flanqués par les ITRs. Les différents transcrits *rep* et *cap* sont produits à partir de leurs promoteurs respectifs (P5, P19, et P40). L'étoile indique le codon alternatif ACG, utilisé pour la production de VP3.

Durant l'infection, le génome de l'AAV est converti en une structure double brin permettant l'expression de gènes viraux et la production de nouveaux génomes viraux simple brin. Pour sa réplication, ce type de virus nécessite l'aide de virus auxiliaires tels que l'adénovirus, le virus de l'herpès ou celui de la vaccine^[174,177] ; on parle de fonction « *helper* ». En l'absence de virus auxiliaire, le cycle viral de l'AAV entre en phase de latence, caractérisée par l'absence d'expression des gènes viraux et la persistance du génome viral sous forme double brin épisomal ou intégré (provirus). Le virus sauvage est ainsi capable de s'intégrer préférentiellement au niveau du bras court du chromosome 19 humain, locus nommé AAVS1^[178-182]. On a longtemps cru que le virus recombinant possédait la même propriété d'intégration. Cependant, son élaboration passe par la soustraction des gènes *rep* et *cap* du génome viral, qui sont ajoutés en *trans*. Ces gènes sont remplacés par le transgène ainsi que les éléments de contrôle de transcription, le tout étant flanqué par les ITRs. Or, les protéines Rep interviennent dans l'initiation de l'intégration site-spécifique de l'ADN viral^[183,184]. Il est par conséquent aujourd'hui accepté que l'intégration spécifique n'a pas lieu (ou à des fréquences très faibles). Par contre, le génome viral est capable de s'associer sous forme de concatémère circulaire avec la chromatine, lui permettant de rester durant une longue période dans les cellules infectées. Ce serait les ITRs qui permettraient de stabiliser les extrémités du génome viral.

Durant la dernière décennie, près d'une dizaine protocoles cliniques de thérapie génique de la mucoviscidose à l'aide de vecteurs AAV2-CFTR ont été effectués. Après avoir montré leur bonne tolérance et procuré quelques résultats encourageants, les essais d'administrations répétées par aérosol à plus grande échelle (100 patients) n'ont pas permis de confirmer ces espoirs, aucune amélioration statistiquement significative de la fonction pulmonaire n'ayant pu être notée^[185]. Ce résultat pourrait être lié à une trop faible efficacité du sérotype AAV2 à transduire *via* le pôle apical, ou encore au développement d'une réponse immune antivirale.

Il n'y a cependant pas de conclusions totalement fermes en ce qui concerne la faisabilité d'administrations répétées de vecteurs AAV chez l'Homme. Les expérimentations précliniques ont en effet donné des résultats très variables en fonction de modèle animal, de la voie d'administration, du sérotype AAV, de la dose, de la durée entre les administrations, ou de l'utilisation (ou non) d'un traitement immunosuppresseur^[173].

Concernant la réponse immunitaire, elle pourrait théoriquement être abolie par l'utilisation de vecteurs dépourvus de capsides. De récents résultats, obtenus par l'équipe de Luis Garcia de l'institut de Myologie à Paris, ont montré que l'injection intra-artérielle de génomes d'AAV nus conduisait à leur expression dans les cellules musculaires, avec des taux acceptables^a. En plus de l'aspect sécuritaire, ce nouveau vecteur nommé AAV0 (AAV zéro) permettrait de transporter des gènes de grandes tailles, alors que la capsid virale limite la taille du transgène à 4,7 kb.

L'AAV et la modulation de l'épissage

Le fait que l'AAV utilise des intermédiaires de réplication concatémériques a permis de contourner la limitation de la taille. La stratégie consiste à scinder un grand gène en deux parties, cloner chaque partie dans deux vecteurs distincts, et les introduire en même temps dans une même cellule. La partie 5' de l'ADNc est clonée dans un vecteur, en aval d'un promoteur choisi, et en amont d'un site donneur d'épissage, alors 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 des ARNm pré-messagers dont la maturation par épissage assemble les deux portions et élimine les répétitions terminales du vecteur, permettant ainsi l'expression de grands gènes^[186–189] (dont *CFTR*^[190]). Par cette technique dite de « *trans-splicing* », des chercheurs du Généthon ont récemment pu contourner le problème de la taille du gène de la dysferline (≈ 7 kb) pour son transfert dans le muscle de souris modèles de dysferlinopathies^[191]. Ce transfert permet la réparation des membranes des fibres musculaires ainsi que l'amélioration de l'activité locomotrice.

Si ces résultats ouvrent la voie à une thérapie génique des dysferlinopathies, ils apportent surtout de nouveaux éléments pour le transfert d'autres « grands » gènes comme le facteur VIII impliqué dans l'hémophilie, mais aussi celui de la dystrophine impliqué dans les dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD). Ces deux dernières maladies sont des variantes cliniques d'un déficit en dystrophine, une protéine clé située sur la face interne de la membrane musculaire, codée par le plus grand gène du génome, nommé *DMD* (79 exons sur le chromosome X). Si le cadre de lecture est respecté par la mutation causale, on observe un phénotype Becker ; si ce n'est pas le cas, on observe un phénotype

^a Communication orale, L. Garcia, *mRNA-based therapeutics for Duchenne muscular dystrophy*, 4^{ème} congrès international de Myologie, Lille, mai 2011

Duchenne. Or, dans ce deuxième cas, la restauration du cadre de lecture peut être obtenue en modifiant l'épissage du transcrit primaire grâce à de petits oligonuléotides anti-sens qui masquent certains sites d'épissage et permettent, *in fine*, la synthèse d'une protéine tronquée mais fonctionnelle^[192,193]. Le saut d'exons thérapeutique a pris encore davantage d'envergure lorsqu'une équipe du Généthon a réussi à restaurer efficacement, chez la souris *mdx (Muscular Dystrophy X-linked)*, la synthèse de dystrophine. L'expérience consistait en une seule administration d'un vecteur AAV (sérotypage 2/1, très efficace pour transduire les cellules musculaires) transportant un minigène codant les ARN adéquats pour réaliser un saut de l'exon 23 dans le transcrit final, ainsi qu'un petit ARN nucléaire (snARN U7, sn pour *small nuclear*) normalement impliqué dans la maturation des transcrits d'histone^[194]. Les résultats montrèrent que la quasi-totalité des cellules du muscle injecté, ou des cellules musculaires du membre perfusé, réexprimait un taux normal de dystrophine au niveau du sarcolème, permettant une résistance normale à l'effort^[5]. Plusieurs essais cliniques visant à faire du saut de différents exons à l'aide de vecteurs AAVs sont en cours actuellement. Les laboratoires associés Prosensa et GSK effectuent actuellement un essai clinique de phase III, concernant le saut de l'exon 51, susceptible de soigner 16 % des malades (GSK2402968/PRO051 ; 180 patients inclus)^a. Les laboratoires vont aussi travailler sur un programme de développement préclinique et clinique du saut des exons 45 (PRO045) et 53 (PRO053) dont l'entrée en phase clinique était prévue durant le premier semestre 2012. Le Pr. Philippe Moullier (Nantes, Evry) va également démarrer un essai de thérapie génique, normalement au courant de l'année 2013, afin de sauter l'exon 51 en utilisant l'AAV/U7 par voie locorégionale.

Si les essais cliniques tentent en premier lieu de sauter uniquement quelques exons, le plus grand bénéfice clinique serait obtenu en faisant un saut des exons 45 à 55. En effet, cela permettrait de traiter 63 % des patients DMD sans pour autant induire d'effets délétères graves^[195].

Cependant, un point reste à considérer. Alors que le génome des patients atteints de DMD ne devrait pas permettre la synthèse de dystrophine, cette protéine est tout de même retrouvée dans certaines cellules musculaires. Ces dernières, appelées « fibres révertantes », sont sans doute le fruit d'une réversion locale de la mutation, ou d'une adaptation locale du système d'épissage de sorte à faire un saut d'exons. Cette production à bas bruit, qui n'intervient que tardivement chez le patient, entraîne la production d'anticorps dirigés contre la dystrophine,

^a Source : <http://www.afm-telethon.fr/>

et peut avoir un impact délétère sur la thérapie génique (de quelque nature qu'elle soit) ainsi que sur l'inflammation ^[196]. La réponse immunitaire est ainsi à considérer pour chacune des maladies génétiques dans lesquelles le produit du transgène n'a jamais été aperçu par le système immunitaire.

d) Autres virus

Au-delà des vecteurs décrits précédemment et fréquemment utilisés en clinique, de nombreux autres virus continuent d'être évalués pour leur potentiel de vectorisation et sont décrits dans la littérature. Les travaux concernent entre autres l'utilisation du virus de l'herpès simplex ^[197] ou du virus de Sendai, notamment en raison de leur tropisme pour les voies respiratoires ^[163,164,198,199]. Les caractéristiques cruciales des vecteurs viraux testés dans des approches de thérapie génique de la mucoviscidose sont résumées dans le Tableau III.

Tableau III: Comparaison des vecteurs viraux envisagés pour la thérapie génique de la mucoviscidose (modifié d'après ^[131])

Vecteur	Intégration	Persistence de l'expression <i>in vivo</i>	Inflammation / Immunogénicité	Etudes d'efficacité sur modèles cellulaires (avec <i>CFTR</i>)	Etudes de sécurité/efficacité sur animaux modèles (avec <i>CFTR</i>)	Essais cliniques chez l'homme
Adénovirus	Non	Non	Fortes	Oui	Oui	Oui
Virus adéno-associé (AAV)	Expression de l'ADN sous forme intégrée et épisomale	Oui	Faibles	Oui	Oui	Oui
Virus de Sendai	Non, cytoplasmique	Non	Fortes	Oui	Oui	Non
Virus parainfluenza	Non, cytoplasmique	Non connue	Pathogène humain	Oui	Non	Non
Virus respiratoire syncytial	Non, cytoplasmique	Non connue	Pathogène humain	Oui	Non	Non
Lentivirus	Oui	Oui	Faibles	Non	Oui	Non
SV40	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Non

e) Conclusion sur les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux sont des vecteurs naturels très efficaces pour le transfert de gènes, en termes de délivrance mais aussi d'expression. Pour cette raison, ils sont utilisés dans la majorité des essais cliniques de thérapie génique. Cependant, ils souffrent de sévères inconvénients que les chercheurs essaient de contourner. En effet, le transport d'un exogène de grande taille est difficile, certains virus engendrent des réactions immunitaires qui empêchent une quelconque réadministration, tandis que d'autres peuvent être pathogènes par mutagenèse insertionnelle ou peuvent le devenir par recombinaison entre le vecteur viral et certaines séquences virales intégrées dans le génome hôte. Enfin, leur production et leur manipulation restent compliquées et coûteuses. Tous ces facteurs ont encouragé les chercheurs à trouver une alternative plus sûre aux vecteurs biologiques, telle que l'utilisation de méthodes dites « physiques », ou de vecteurs synthétiques.

2. Les méthodes physiques

L'administration d'ADN médicament « nu » est non seulement la méthode la plus simple pour administrer du matériel génétique, mais c'est également la plus sûre car l'ajout de toute molécule différente du soi augmente le risque de réponse immunitaire chez l'hôte. De nombreuses techniques dites « physiques » ont été développées pour favoriser l'entrée des acides nucléiques dans des organes isolés ou dans un organisme entier ([Figure 20](#)).

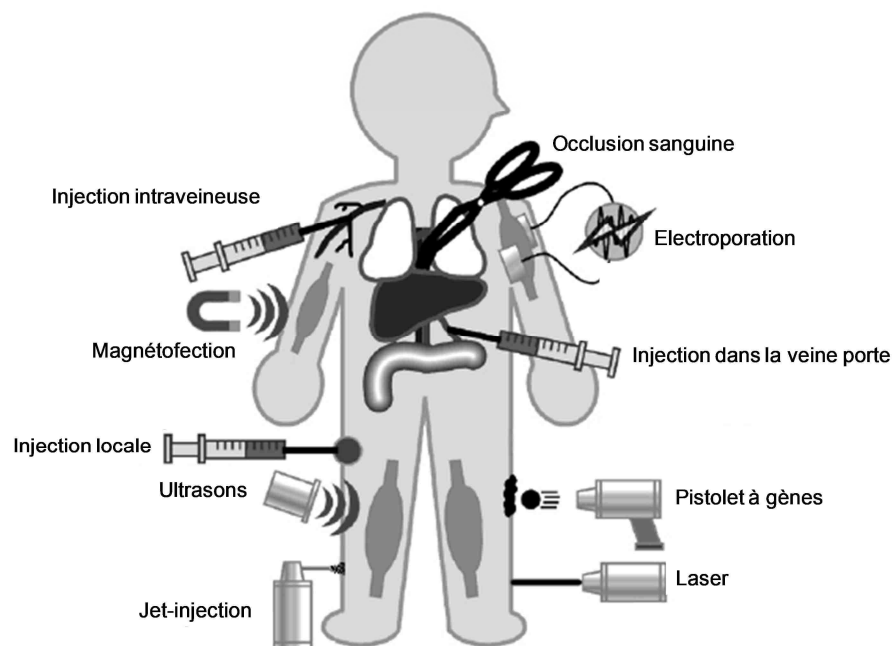


Figure 20 : Principales méthodes physiques de transfert de gènes (modifiée d'après ^[200])

a) L'ADN nu

En raison de sa nature polyanionique, on a longtemps pensé que l'ADN ne pouvait franchir passivement les membranes cellulaires, elles aussi chargées négativement. Mais au début des années 1990, des expériences ont montré qu'un transgène pouvait être exprimé dans les cellules musculaires pendant une durée d'au moins deux mois, suite à une simple injection intramusculaire d'ADN nu ^[201]. Cependant, cette technique reste peu efficace puisque moins de 1 % de la dose injectée est internalisée par les cellules, et l'expression reste localisée au niveau du site d'injection. Cette stratégie semblait par conséquent restreinte aux organes directement accessibles tels que la peau ou le muscle. Néanmoins, l'injection dite « hydrodynamique », consistant à injecter un grand volume (équivalant au volume sanguin de l'animal modèle) d'une solution isotonique d'ADN nu dans la veine caudale de souris et de rats, a par la suite montré que celui-ci était exprimé au niveau hépatique ^[202-204]. L'excès de liquide, s'accumulant au niveau de la veine cave inférieure ^[205], induit une surpression qui perméabilise l'endothélium capillaire ainsi que les hépatocytes, et permet le passage de l'ADN ^[200,205]. Des études plus récentes ont permis d'obtenir des résultats similaires après injection hydrodynamique dans la veine saphène tout en bloquant la circulation sanguine avoisinante, l'ADN étant alors transféré dans 10 à 40 % des cellules musculaires ^[206,207]. Un dispositif d'injection contrôlée par ordinateur a également été mis au point de façon à standardiser le protocole, et ainsi réduire au maximum les variables liées à l'expérimentateur ^[208]. Cependant, l'ADN non protégé reste susceptible d'être dégradé rapidement par les DNAses présentes dans le sérum, ou éliminé suite à sa reconnaissance par le système des phagocytes mononucléés (SPM).

b) Le canon à ADN

Le canon à ADN (ou *gene gun*) consiste à adsorber de l'ADN nu autour de particules métalliques inertes de 1 à 5 µm de diamètre (d'or ou de tungstène), et les propulser à l'aide d'un gaz sur les cellules ou le tissu cible. Cette technique, utilisée pour la première fois sur des cellules végétales à la fin des années 1980 ^[209], fut étendue aux cellules et tissus mammifères au début des années 1990 ^[210,211]. Une étude récente a permis de trouver une alternative à l'introduction de métaux, non biodégradables, dans l'organisme. Lee et collègues ont montré que l'utilisation des nanoparticules de chitosan (voir page 67), en combinaison avec le système

de canon à ADN, permettait d'obtenir des résultats similaires aux particules métalliques^[212]. Cette technique reste néanmoins essentiellement envisagée pour l'immunisation, la peau étant alors le principal tissu cible^[213].

c) La jet injection

La *jet injection* est un moyen d'administration locale de substances, permettant d'éviter tout recours à une aiguille. A l'heure actuelle, cette technique n'est utilisée que pour la délivrance d'hormones, d'anesthésiants locaux, d'insuline ou pour l'immunisation^[214]. Cependant, cette technologie peut également être utilisée dans le cadre du transfert de gènes. En effet, lors d'une *jet injection*, le liquide contenant les acides nucléiques est envoyé sous forme d'un jet à haute pression sur le tissu cible, ce qui favorise le passage des acides nucléiques dans les cellules. Des expériences ont ainsi été menées dans le cadre d'un transfert de gènes pour le cancer du côlon^[215,216], ou encore pour l'immunisation génétique^[217,218]. Cette technique est également testée pour augmenter la délivrance d'ADN couplé à des particules polymériques^[219]. Cependant, cette technologie n'en est encore qu'à ses débuts et, tout comme le canon à ADN, les zones plus profondes restent difficilement accessibles.

d) La sonoporation

La sonoporation est une technique consistant à appliquer des ultrasons de façon à perméabiliser les membranes cellulaires et ainsi augmenter la pénétration de molécules d'intérêt. Dans le cadre du transfert de gènes, l'ADN nu est en général co-injecté avec des microbulles (de 1 à 3 µm de diamètre, initialement utilisées comme agents de contraste dans l'imagerie par ultrasons) qui sont constituées de protéines, de lipides ou de polymères, et remplies d'air ou d'un gaz inerte. Les microbulles OptisonTM (GE Healthcare) sont par exemple constituées de perfluoropropane, encapsulé dans une sphère d'albumine humaine. Le mécanisme de la sonoporation n'est pas totalement élucidé mais il pourrait être expliqué par le phénomène dit de « cavitation acoustique »^[220]. Lors de la propagation d'ultrasons dans un liquide, des phases de compression et de dépression d'un élément de liquide se créent. 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. Cette cavitation

acoustique entraînerait donc une perturbation mécanique, associée à une libération d'énergie, qui perméabiliserait les membranes des cellules avoisinantes. Le niveau de perméabilisation membranaire dépend de la fréquence et de l'intensité des ultrasons, ainsi que de la durée d'exposition^[221]. La sonoporation peut également permettre d'augmenter la transfection à l'aide de polyéthylèneimine (PEI, voir page 64) en favorisant, sans altérer l'ADN, l'entrée des complexes dans la cellule^[222]. Chez l'animal, cette technique s'est montrée efficace pour transférer des gènes dans le muscle et les tumeurs^[223-225], mais également dans des organes profonds tels que le cœur et le pancréas après administration systémique d'ADN plasmidique^[226]. Chez le rat, l'injection de plasmides (portant un promoteur de l'insuline) accompagnés de microbulles au niveau de la veine jugulaire, a par ailleurs conduit à l'expression du transgène au niveau des cellules β du pancréas^[227].

e) L'électroporation

L'électroporation utilise l'effet de courtes impulsions d'un champ électrique pour induire une électroperméabilisation transitoire des membranes cellulaires, et permettre la pénétration d'acides nucléiques ou autres molécules d'intérêt. Cette méthode de transfert d'ADN est utilisée depuis le début des années 1980^[228], *in vitro*^[229] et *in vivo*, principalement à destination de la peau et du muscle (mélanome^[230], vaccination^[231]). Néanmoins, cette technique a également été testée pour le transfert d'ADN au niveau de l'épithélium pulmonaire de souris et de mouton, permettant une expression du transgène 100 fois plus forte qu'après administration d'ADN nu^[232].

f) La magnétofection

Cette technique fait appel à l'utilisation d'un fort champ magnétique permettant l'accumulation d'acides nucléiques couplés à des nanoparticules magnétiques (à base d'oxyde de fer) sur les membranes des cellules cibles, l'ADN parvenant alors à entrer à l'intérieur des cellules. Cette technique a également été utilisée en combinaison avec des vecteurs biologiques (viraux) et synthétiques (lipides, polymères) dans plusieurs essais *in vitro* et *in vivo*^[233].

3. Les vecteurs synthétiques

Etant donné que les vecteurs viraux sont certes efficaces mais présentent divers inconvénients majeurs, et que les méthodes physiques de transfert de gènes s'appliquent difficilement aux organes profonds, les recherches se sont orientées en parallèle vers la mise au point de vecteurs synthétiques, obtenus par synthèse chimique. Il s'agit pour la grande majorité d'entre eux de molécules cationiques capables d'interagir de façon électrostatique avec l'ADN chargé négativement. Il en résulte la formation de complexes nanométriques vecteur/ADN qui peuvent être internalisés par les cellules. L'ADN, en général un plasmide comportant une cassette d'expression eucaryote du transgène, est alors libéré dans le cytoplasme puis transcrit après migration dans le noyau^[234].

Bien qu'il soit difficile de mener des études comparatives entre vecteurs viraux et vecteurs synthétiques, les études précliniques montrent que les vecteurs synthétiques sont généralement moins efficaces que les virus recombinants. Ceci est largement imputable au manque d'éléments spécifiques utiles lors des différentes étapes (extracellulaires et intracellulaires) qu'il leur est nécessaire de franchir avant que l'acide nucléique puisse exercer le rôle escompté, les virus ayant quant à eux été naturellement façonnés dans ce but.

Cependant, la relative simplicité des vecteurs synthétiques peut constituer un avantage pour le traitement d'une maladie chronique comme la mucoviscidose, puisque des réadministrations efficaces seront sans doute nécessaires et s'avéreront plus faciles à réaliser qu'avec des vecteurs viraux, notamment en termes de réaction inflammatoire, dans un environnement qui est lui-même inflammatoire. Les vecteurs synthétiques sont également plus simples à élaborer et d'un moindre coût (même à grande échelle), facilement documentables sur le plan physicochimique, et peuvent en principe transporter des transgènes de grandes tailles. La séquence nucléique transportée par les vecteurs synthétiques a par ailleurs une importance toute particulière qui a longtemps été négligée. Des progrès importants ont en effet été réalisés durant les dix dernières années en ce qui concerne le *design* du plasmide transporté, et notamment pour la mucoviscidose^[235].

La suite du manuscrit va ainsi traiter des différentes familles de vecteurs synthétiques, de leurs devenir dans les fluides biologiques et des améliorations qui peuvent être apportées afin d'optimiser leur efficacité lors de chaque étape du transfert de gènes (transfection). Nous

parlerons également des améliorations apportées au niveau des séquences nucléiques transportées.

a) Généralités sur les vecteurs cationiques

La propriété commune à l'ensemble des divers vecteurs cationiques est leur capacité de s'associer par interactions électrostatiques avec les groupements phosphates des acides nucléiques (chargés négativement). Il en résulte des agrégats plus ou moins homogènes appelés polyplexes (ADN/polymère), lipoplexes (ADN/liposomes) ou lipopolyplexes (ADN/polymère/liposome), à l'intérieur desquels les acides nucléiques se retrouvent compactés^[236].

Schématiquement, l'utilisation des vecteurs synthétiques nécessite qu'ils possèdent les caractéristiques suivantes :

- ✓ Former un complexe avec les acides nucléiques à véhiculer
- ✓ Assurer la protection des acides nucléiques face aux diverses sources de dégradation
- ✓ Faciliter la fixation des complexes contenant les acides nucléiques sur les cellules, ainsi que leur internalisation
- ✓ Favoriser le passage des acides nucléiques hydrophiles à travers le milieu hydrophobe constitué de la membrane plasmique et/ou endosomale
- ✓ Permettre le trafic intracellulaire ainsi que la pénétration nucléaire des acides nucléiques.

Il faut tout de même noter qu'il existe également des composés neutres, étudiés pour leur potentiel dans le domaine de la vectorisation, qui ne seront pas abordés dans ce manuscrit. On peut simplement citer le Pluronic[®], un copolymère à bloc qui, bien que ne compactant pas l'ADN et étant inactif *in vitro*, se révèle efficace pour la transfection du muscle squelettique^[237].

b) Les polymères cationiques

Ces vecteurs synthétiques sont, comme leurs noms l'indiquent, composés de polymères portant des charges positives répétées permettant une condensation très efficace des acides nucléiques. Le polyplexe ainsi formé est transitoirement stable. Les polymères peuvent être classés en quatre grandes familles selon leur nature.

(1) Les dérivés de la poly-L-lysine

La poly-L-lysine (PLL) est le premier polymère cationique à avoir été utilisé pour le transfert d'acides nucléiques^[238,239]. Ce polymère, formé de plusieurs lysines (Figure 21), est de faible poids moléculaire (<3 kDa) et possède un pKa de 10,2. Cette constante d'équilibre lui permet d'être chargé positivement au pH physiologique (7,4) et d'interagir ainsi avec les acides nucléiques.

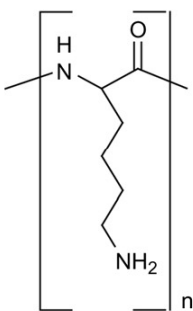


Figure 21 : Structure chimique de la PLL

La poly-L-lysine peut former des particules biodégradables de 50 à 700 nm de diamètre, et sa liaison avec les acides nucléiques est fonction de son degré de condensation. En général, seules les PLL de haut poids moléculaire (>3 kDa) sont capables de former des complexes stables avec les acides nucléiques, illustrant l'importance du nombre d'amines primaires sur la condensation de l'ADN^[240]. Cependant, de petits oligomères de lysine, (Lys)₁₆, couplés à des peptides fusogènes, permettent une condensation efficace de l'ADN et augmentent la translocation nucléaire dans les cellules endothéliales de cornée en culture^[241-243]. Cette translocation nucléaire n'est en revanche pas observée pour les PLL de haut poids moléculaires, qui ne permettent un transfert de gènes que sur les cellules non quiescentes^[244]. Bien que plus efficaces pour condenser l'ADN, l'utilisation de PLL de haut poids moléculaires conduit à de forts niveaux de cytotoxicité^[245]. Cette toxicité peut cependant être réduite en incorporant des groupements imidazole dans la chaîne de PLL^[246],

ou en utilisant des dérivés dendritiques de PLL^[247]. Les PLL de haut poids moléculaires ont également tendance à former, en présence d'ADN, des complexes qui s'agrègent et précipitent en fonction de la force ionique de la solution^[248]. Une façon d'éviter la formation de précipités insolubles est de formuler des copolymères à bloc de PLL en présence de polyéthylène glycol (PEG ; CH₂-CH₂-O)^[249]. L'utilisation de dextran^[250], de poly[N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide] (PHPMA)^[251], ou de l'agent de réticulation diméthyl-3,3'-dithiobispropionimide (DTBP)^[252] permet également d'augmenter la stabilité des polyplexes à base de PLL.

Une multitude d'autres dérivés de PLL ont été synthétisés dans le but de diminuer la toxicité et d'accroître la sortie endosomale des complexes (la PLL ne possède pas de pouvoir tampon car toutes les fonctions amines sont protonées à pH physiologique^[253]). Ces composés incorporent notamment des liaisons réductibles (de type disulfure)^[254] ou hydrolysables (de type ester), ou encore des résidus histidines dont le noyau imidazole peut jouer le rôle de tampon^[255,256].

Des études de biodistribution *in vivo* ont montré que les polyplexes contenant des chaînes de PEG restaient dans la circulation sanguine pendant 3 jours, suggérant que ces chaînes hydrophiles pouvaient promouvoir l'adsorption des protéines plasmatiques à la surface des nanoparticules et ainsi les masquer, empêchant par là leur dégradation (dysopsonisation)^[257].

Néanmoins, l'efficacité de ce vecteur reste faible s'il n'est pas associé un ligand permettant un ciblage cellulaire précis. Ces ligands peuvent être des sucres (lactose^[258,259], mannose^[260], galactose^[261-263]), des protéines (transferrine, insuline)^[264], ou encore des anticorps^[265]. Le ciblage des cellules tumorales peut être amélioré par couplage de la PLL avec des motifs folate^[266,267] et transferrine^[264,268,269]. La complexation de PLL avec un peptide dérivé de l'apoprotéine E (ApoE), ciblant les récepteurs aux LDL (*Low Density Lipoproteins*), permet de franchir la barrière hématoencéphalique et ainsi délivrer des gènes dans les cellules du cerveau *in vivo*^[270]. Le couplage de la PLL avec l'anticorps monoclonal 34A, ciblant la thrombomoduline présente à la surface des cellules, permet une accumulation préférentielle des complexes dans les poumons de souris après administration systémique, alors que la PLL non conjuguée est quant à elle retrouvée majoritairement dans le foie. Néanmoins, l'expression pulmonaire du transgène avec ce type de vecteurs reste modérée^[271].

(2) Les dérivés de la polyéthylèneimine

La polyéthylèneimine (PEI), initialement connue pour ses applications dans l'industrie du papier et en chromatographie, fut utilisée pour la première fois pour le transfert de gènes par J.-P. Behr et son équipe au milieu des années 1990^[272], puis commercialisée sous les noms d'ExGen500 et de JetPEI^[273]. Depuis, ce polymère a été décliné afin d'améliorer les propriétés physicochimiques et le devenir biologique des polyplexes^[274]. La PEI a une structure chimique particulière ; elle incorpore une amine tous les trois atomes (Figure 22) qui lui confère une densité de charges positives extrêmement élevée. De plus, étant donné que seules environ 20 % des fonctions amines de la PEI sont protonées au pH physiologique, les amines non protonées assurent un pouvoir tampon dit « d'éponge à protons », bénéfique durant le trafic intracellulaire des polyplexes^[275] (voir page 93). Selon son degré de polymérisation, la PEI peut être sous forme linéaire ou branchée, et de poids moléculaire variable. Les complexes formés avec l'ADN sont de morphologie toroïdale ou « donuts »^[276].

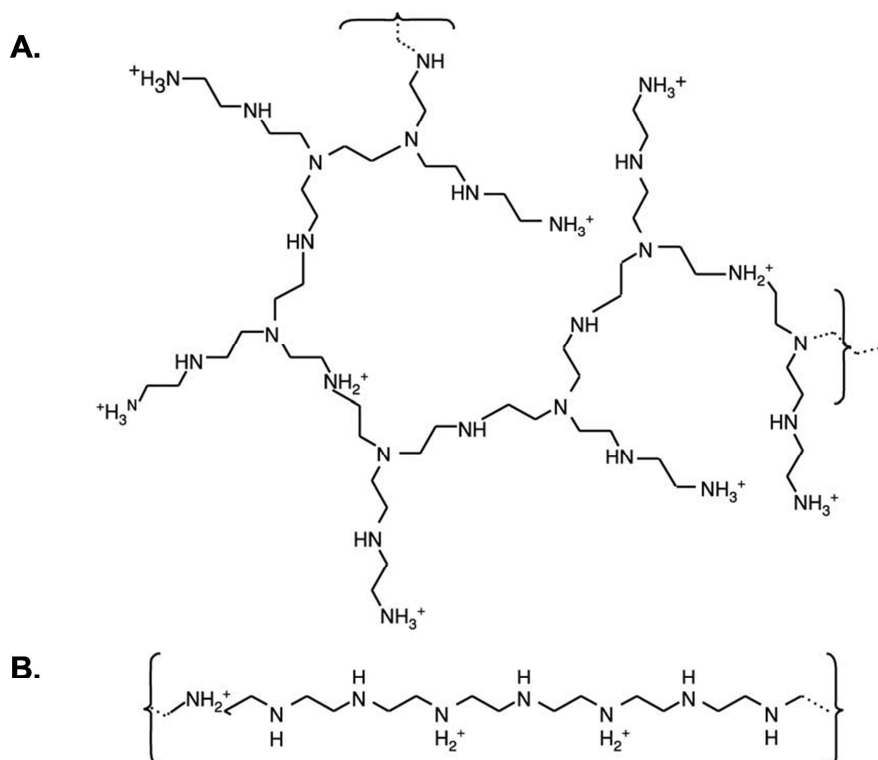


Figure 22 : Structures chimiques de la PEI sous forme branchée (b-PEI) (A) et sous forme linéaire (l-PEI) (B).

L'efficacité des polyplexes augmente proportionnellement au poids moléculaire de la PEI (entre 600 et 70 000 Da)^[277], mais cela engendre également une cytotoxicité plus importante^[278]. Cette dernière serait due à l'agrégation des polyplexes à la surface des cellules, conduisant à leur nécrose^[279]. Le poids moléculaire optimal pour la formation des

polyplexes à base de PEI se situe ainsi entre 5 et 25 kDa^[274], la forme linéaire présentant le meilleur profil efficacité/toxicité à des N/P élevés (N/P : rapport entre les azotes portés par la PEI et les phosphates de l'ADN)^[280]. Pour autant, à masse moléculaire égale, c'est la forme branchée qui permet une meilleure condensation de l'ADN^[281], les complexes formés étant alors également plus stables en raison du plus grand nombre d'amines primaires^[282].

Comme pour la plupart des vecteurs synthétiques, une multitude de variations chimiques a été apportée à la PEI afin d'accroître son efficacité, diminuer sa toxicité, ou encore permettre un ciblage cellulaire. L'ajout de chaînes PEG est sans doute la modification la plus utilisée, afin de créer une zone extérieure hydrophile permettant de limiter les interactions avec les protéines plasmatiques et autres éléments sanguins. Comme pour la PLL, son utilisation permet d'augmenter le temps de circulation sanguine des polyplexes, de diminuer la toxicité induite, mais réduit également la capacité de transfection. En effet, une réduction de la charge de surface des copolymères entraîne une diminution des interactions avec les membranes cellulaires, et par conséquent leur entrée dans la cellule^[277]. L'ajout de motifs permettant un ciblage cellulaire a alors toute son importance, de façon à éviter que les complexes ne restent indéfiniment dans la circulation sanguine. Ainsi, des copolymères PEI-PEG fonctionnalisés avec des motifs peptidiques RGD (Arginine - Glycine - Acide Aspartique ; motif qui est d'ailleurs à l'origine de l'entrée des adénovirus dans les cellules) pour cibler les récepteurs aux intégrines présentes à la surface des cellules endothéliales^[283], ou avec différents sucres pour cibler les cellules pulmonaires^[283-286] ou hépatiques^[287], ont montré des résultats intéressants *in vitro* et *in vivo*.

L'efficacité de la PEI branchée (25 kDa) a également été démontrée *in vivo* pour le transfert de gènes par aérosol dans les voies respiratoires, l'expression du gène rapporteur étant détectée dans les cellules épithéliales de l'ensemble du tractus respiratoire murin^[288,289] et ovin^[290]. De plus, une résistance des complexes particulièrement efficace face au processus de nébulisation a pu être observée^[291,292]. En revanche, l'instillation de complexes formés de PEI linéaire (22 kDa), bien que permettant d'obtenir une expression pulmonaire transitoire du transgène chez le rat, est accompagnée d'une inflammation sévère dès le lendemain de l'administration^[293].

L'essai clinique le plus prometteur avec la PEI concerne le cancer superficiel de la vessie, et est actuellement en phase 2b^a. Le gène transféré chez les patients, qui code la sous-unité B de la toxine diphtérique, est sous contrôle d'un promoteur spécifique des cellules cancéreuses. Les complexes sont administrés par voie locale (intra-vésicale). Les essais préliminaires (phase I/IIa) avaient préalablement permis de montrer une régression totale des marqueurs cancéreux chez la moitié des patients inclus^[294]. L'avantage de la cible thérapeutique est double : (i) le tissu cible se rapproche d'une monocouche de cellules en culture ce qui facilite l'accès à l'ensemble des cellules à traiter, et (ii) de grands volumes peuvent être administrés (jusqu'à 150 mL) permettant en partie de compenser l'efficacité modérée de la PEI par un très grand nombre de complexes délivrés.

(3) Les dendrimères

Les dendrimères sont des polymères de type polyamidoamines (PAMAM, Starburst™), développés initialement par le Pr. Szoka et son équipe^[295], caractérisés par une structure ramifiée (le nom vient du grec *dendron* : « arbre » et *meros* : « partie »). Celle-ci comporte une forte densité d'amines primaires qui lui confère une grande capacité à compacter les acides nucléiques (Figure 23A).

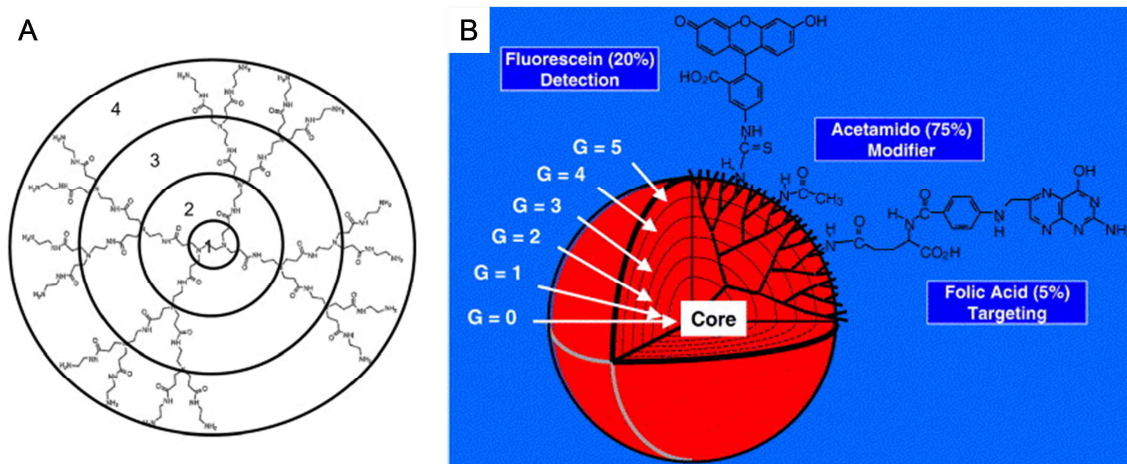


Figure 23 : (A) Structure d'un dendrimère PAMAM de 4^{ème} génération. (B) Représentation schématique de l'échafaudage d'un dendrimère auquel peuvent être liés des motifs de ciblage, des modificateurs de solubilité ou encore des motifs fluorescents^[296].

Leur taille est directement liée au nombre de cycles de polymérisation effectués pour leur synthèse (degré de réticulation exprimé en « génération »), l'efficacité de transfection

^a Sources : <http://www.biocancell.com/clinical-trials/bladdertrial> ; Communication orale, J.P. Behr, *Thérapie génique non-virale*, Collège de France, Paris, 2011 : <http://www.college-de-france.fr>

optimale étant obtenue avec des polymères de génération 5 à 7. L'efficacité de transfert de gènes peut être améliorée avec des polyplexes formés à partir de polymères dégradés, formant des complexes plus stables sans doute moins toxiques^[297]. Ce type de polymères peut être combiné avec des peptides fusogènes, des motifs de ciblage cellulaires, ou des motifs modifiant leur solubilité, tout cela afin d'améliorer leur capacité intrinsèque de transfert de gènes (Figure 23B ; pour revues^[298,299]).

(4) Le chitosan

Le chitosan (Figure 24) est un polysaccharide provenant de la désacétylation de la chitine, un polysaccharide constitutif de l'exosquelette des insectes et des crustacés^[300]. Il est ainsi biodégradable et biocompatible. Sa nature polycationique lui permet d'interagir avec les acides nucléiques pour former de petits complexes (20-500 nm) stables, ces caractéristiques étant directement liées à leur poids moléculaire ainsi qu'à leur degré de désacétylation (DDA)^[301]. Des études ont montré que les efficacités de transfection étaient supérieures pour des chitosans de faible poids moléculaire (≤ 30 kDa)^[302,303], suggérant une meilleure dégradation des complexes ainsi qu'une meilleure libération de l'ADN à l'intérieur des cellules. D'autres études montrent qu'un meilleur compromis entre la capacité à protéger, transporter, et relarguer l'ADN était atteint avec des chitosans de poids moléculaire intermédiaire (30-100 kDa)^[304-306]. La toxicité induite, bien que relativement faible, est également dépendante du DDA du polymère, les chitosans de faible DDA étant les moins toxiques *in vitro*^[307].

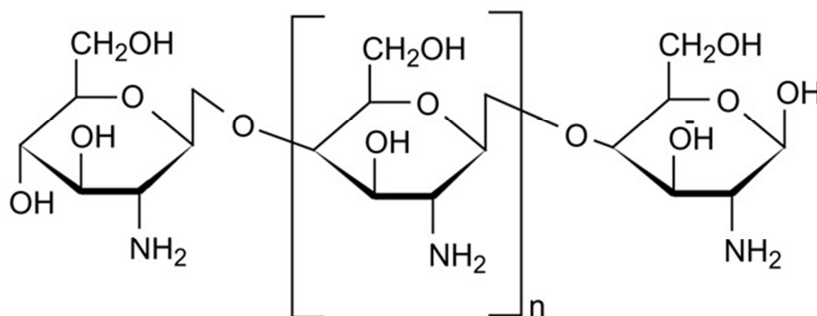


Figure 24 : Structure du chitosan

c) Les lipides cationiques

L'utilisation de liposomes est la première stratégie à avoir été envisagée pour transférer un exogène dans une cellule hôte. Au milieu des années 70, des études ont d'abord montré le potentiel des liposomes à fusionner avec les membranes cellulaires^[308,309], puis à délivrer un ARNm exogène de globine^[310–312], des chromosomes^[313], et de l'ADN^[314,315]. Puis, vint la première transformation stable d'une lignée cellulaire à l'aide de liposomes, apportant le gène de la thymidine kinase dans des cellules LTK⁻. Après quelques essais supplémentaires de transfert d'acides nucléiques encapsulés dans des liposomes classiques^[315–317], le Pr. Felgner et son équipe (Etats-Unis) ont développé, dès 1987, un premier lipide cationique synthétique : le DOTMA (chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium) (Figure 26)^[38], introduisant le terme de « lipofection » pour désigner la transfection à l'aide de lipides cationiques. C'est presque au même moment que le Pr. Behr et son équipe mirent au point une lipopolyamine : le DOGS (dioctadécylamine-glycine-spermine)^[318]. Depuis, de nombreux lipides cationiques ont été synthétisés, dont certains furent commercialisés.

Les lipides cationiques partagent généralement un même schéma structural. Il s'agit de molécules amphiphiles composées de trois domaines (Figure 25) :

- une **tête polaire** hydrophile chargée positivement, composée le plus souvent d'une ou plusieurs fonctions amines protonées et pouvant donc interagir électrostatiquement avec les phosphates des acides nucléiques pour former spontanément un assemblage supramoléculaire ADN/lipides appelé lipoplexe.
- un **bras espaceur** (ou « linker ») dont la taille et la nature influencent la stabilité et la biodégradabilité du vecteur. Des liens clivables, sensibles à l'acidité des endosomes ou à un changement de potentiel oxydo-réducteur ont été créés afin de favoriser le relargage de l'ADN plasmidique. Le bras espaceur peut également offrir des sites pour l'introduction de nouvelles fonctions, permettant un meilleur ciblage et une optimisation du trafic intracellulaire du complexe.
- un **domaine hydrophobe**, composé soit de deux chaînes lipophiles aliphatiques saturées (linéaires ou ramifiées) ou insaturées, soit d'un motif cholestéryle. Quelques rares exemples de lipides cationiques ne présentant qu'une seule chaîne lipidique existent

néanmoins^[319]. Le domaine hydrophobe est impliqué dans l'assemblage supramoléculaire, mais influence aussi la stabilité des membranes biologiques de par ses propriétés physicochimiques.

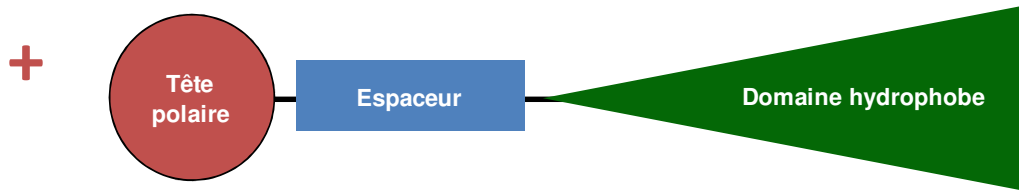


Figure 25 : Représentation schématique des différents domaines d'un lipide cationique

Le complexe formé, de charge apparente positive, interagit notamment avec des protéines membranaires anioniques telles les protéoglycanes^[320]. Cette attraction initie l'internalisation des lipoplexes dont le mécanisme sera détaillé par la suite (voir page 90).

On peut classer les lipides cationiques en trois grandes familles : les **lipides monocationiques**, les **lipides polycationiques** et les **lipides dérivés du cholestérol** (mono ou polycationiques). Les différentes structures ayant été largement répertoriées^[321–326], seuls les exemples les plus significatifs seront présentés par la suite. Point important, la plupart de ces lipides cationiques sont formulés sous forme de liposomes cationiques en association avec un colipide zwitterionique ou neutre, principalement la DOPE (dioléoyl-phosphotidyléthanolamine) (Figure 26), favorisant la transfection par ses propriétés fusogènes (voir page 79). Comme les polymères, les lipides cationiques peuvent également être recouverts à leur surface par des motifs hydrophiles de PEG qui, *in vivo*, diminuent les interactions avec les protéines du sérum et favorisent ainsi leur furtivité vis-à-vis du système des phagocytes mononucléés.

(1) Lipides monocationiques

Le premier lipide monocationique fut le DOTMA, un composé présentant deux chaînes monoinsaturées (oléiques) et une tête cationique de type ammonium quaternaire, reliées par un espaceur 2,3-propyl-di-oxy^[38]. Le Pr. Felgner avait alors obtenu d'excellentes efficacités de transfection sur différentes lignées cellulaires, largement supérieures à celles obtenues avec du diethylaminoethyl (DEAE) dextran ou du phosphate de calcium. Ce produit, mélangé au

rapport massique 1/1 avec le lipide zwitterionique DOPE, est commercialisé sous le nom de Lipofectine (Invitrogen).

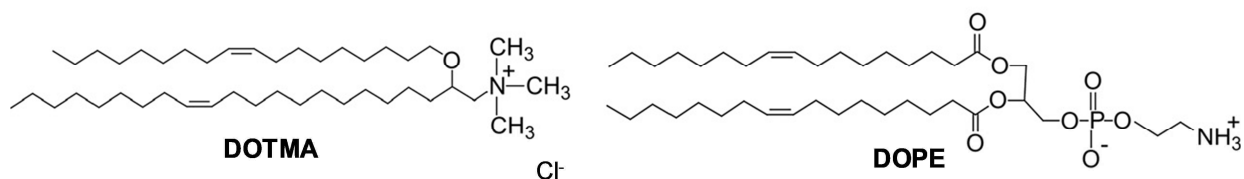


Figure 26 : Structures du lipide cationique DOTMA et du lipide zwitterionique DOPE

De nombreux analogues du DOTMA furent synthétisés par la suite, les investigateurs cherchant à augmenter le pouvoir transfectant en modulant la longueur des chaînes aliphatiques, ainsi que la taille et la nature du bras espaceur reliant la tête polaire et le domaine hydrophobe. Dans le DOTAP (méthylsulfate de N-[1-(2,3 dioléoyloxy) propyl](N,N,N-triméthylammonium)^[327], l'espaceur fut modifié en remplaçant les fonctions éthers par des fonctions esters afin de réduire la cytotoxicité^[328].

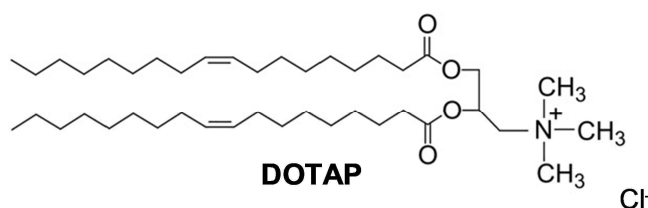


Figure 27 : Structure du lipide cationique DOTAP

Des modifications ont encore été apportées par la suite, comme l'utilisation d'une tête polaire hydroxyéthylée favorisant l'hydratation du lipide et par conséquent l'efficacité de transfection^[329,330].

Depuis, une multitude de dérivés monocationiques possédant des variations au niveau des trois domaines structuraux ont été synthétisés et évalués pour leur capacité de transfection *in vitro* et *in vivo*, permettant de mieux comprendre les relations structure chimique/activité biologique^[325].

(2) Lipides polycationiques

Le chef de file historique de cette famille de lipides cationiques est le DOGS, une lipopolyamine dérivée de la spermine (Figure 28)^[318]. Si ce composé peut être utilisé sans adjonction de colipide, les lipoplexes DOGS/DOPE, commercialisés sous le nom de Transfectam® (Promega), présentent une meilleure efficacité de transfection.

Depuis, divers analogues ont été mis au point. Par exemple, le DOSPA (2,3-dioléyloxy-N-[2-(spermine-carboxamido)éthyl]-N,N-diméthyl-1-propanammonium trifluoroacétate ; Figure 28), appelé Lipofectamine™ (Invitrogen) lorsqu'il est mélangé au rapport massique 3/1 avec la DOPE, a été utilisé pour la transfection de nombreuses lignées cellulaires et cultures primaires. La Lipofectamine™ est d'ailleurs souvent utilisée comme référence lors de l'évaluation *in vitro* de nouveaux agents de transfection.

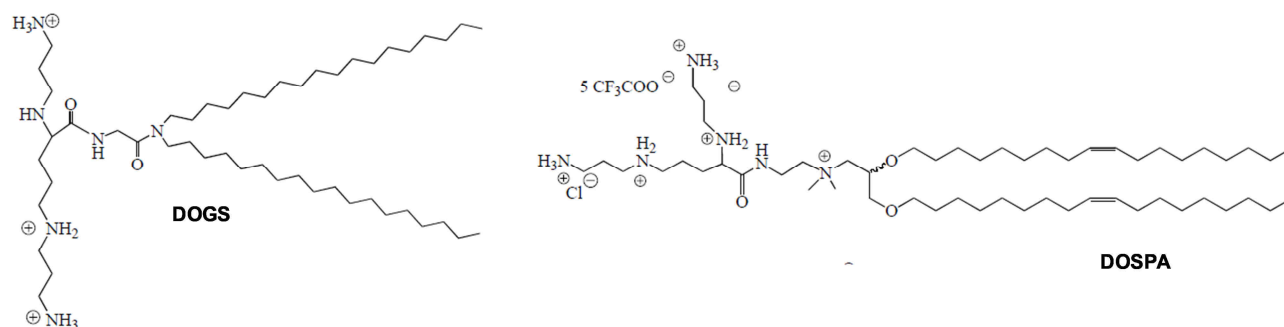


Figure 28 : Structures des lipides polycationiques DOGS et DOSPA

Les liposomes formés à partir de lipides portant plusieurs charges cationiques ont logiquement une plus forte densité de charges que ceux formés à partir de lipides monocationiques, procurant une affinité plus grande pour les acides nucléiques, et souvent une efficacité de transfection supérieure. Par ailleurs, la tête polaire de type spermine n'est sans doute que partiellement protonée au pH physiologique, ce qui peut jouer, à l'instar de la PEI, un rôle dans le devenir intracellulaire des lipoplexes^[275] (voir page 92).

Enfin, il est à noter l'importance du bras espaceur des lipides polycationiques dérivés de la spermine. En effet, comme la tête polaire se lie à l'ADN au niveau du petit sillon de la double hélice, le linker doit être suffisamment long afin d'éviter les encombrements stériques entre l'ADN et le pôle hydrophobe du lipide cationique^[331].

(3) Lipides cationiques dérivés du cholestérol

Le cholestérol, à l'état naturel dans les cellules, est responsable de la rigidité des membranes. De ce fait, il apporte au lipide cationique des caractéristiques physicochimiques et biologiques différentes d'un pôle hydrophobe à deux chaînes grasses. De nombreux dérivés cationiques du cholestérol ont été synthétisés et leurs efficacités de transfection évaluées. Les liposomes contenant de tels dérivés cationiques présentent une meilleure stabilité dans un milieu de force ionique élevée, ainsi qu'en présence de résidus portés par les muqueuses et chargés négativement^[328,332]. Ils présentent en outre une activité fusogène équivalente voire supérieure aux lipides cationiques à double chaîne aliphatique.

Le premier dérivé du cholestérol décrit fut le DC-Chol ([3-β-N-(N', N'diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol ; [Figure 29](#)), synthétisé au début des années 1990 par l'équipe du Pr. Huang aux Etats-Unis^[333]. Utilisé en association avec la DOPE, ce composé a notamment démontré sa capacité à transfecter l'épithélium nasal de patients atteints de mucoviscidose^[334]. C'est d'ailleurs lors de cet essai clinique qu'a été établie la preuve de principe du potentiel des vecteurs synthétiques à être réadministrés efficacement par les voies aériennes humaines.

Une série de dérivés cationiques du cholestérol furent synthétisés par la suite et notamment le GL67 (N4-spermine cholesterylcarbamate ; Genzyme Corporation) et le BGTC (bis(guanidinium)-tren-cholestérol). Le premier composé cité, combiné avec la DOPE ainsi qu'un stabilisateur stérique (DMPE-PEG5000), est actuellement utilisé dans un essai clinique sur la mucoviscidose en Grande-Bretagne. Les nombreuses études précliniques réalisées avec le GL67 ont notamment montré qu'il permettait, après instillation nasale, d'obtenir une expression du transgène principalement localisée au niveau des pneumocytes de type I, alors que celle médiée par la PEI était plutôt localisée au niveau des cellules ciliées et des cellules de Clara^[335].

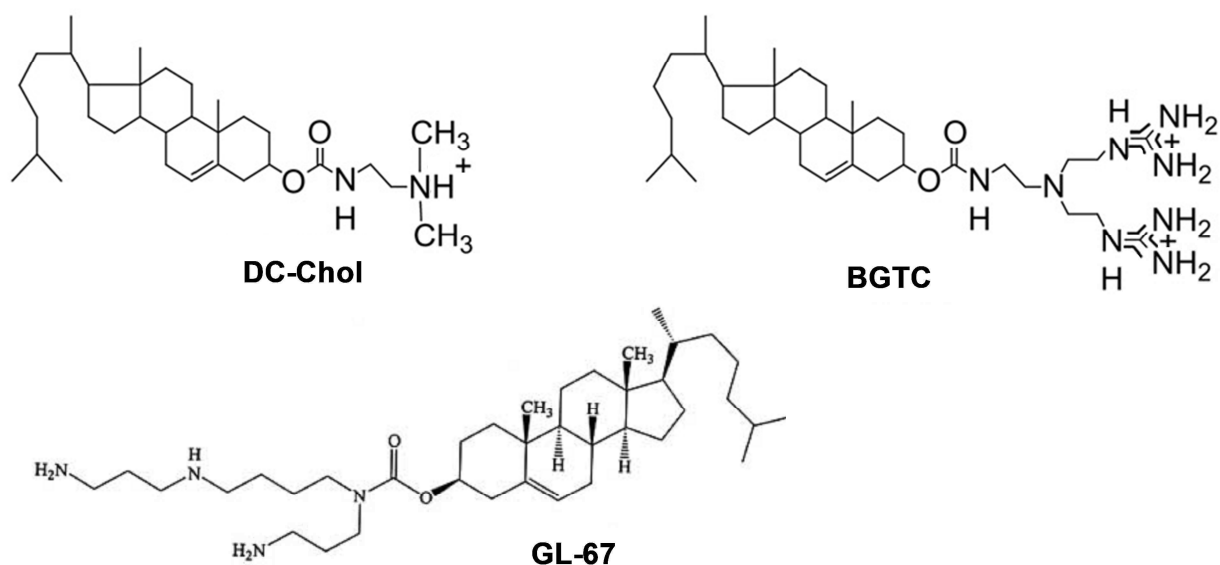


Figure 29: Structures du DC-Chol, du BGTC et du GL67

Le BGTC est caractérisé par une tête polaire de type guanidinium (Figure 29), favorisant les interactions avec les acides nucléiques ^[336]. En effet, ce groupement est, du fait de sa forte basicité, protoné sur une gamme de pH plus importante qu'un groupement amine. En conséquence, la liaison à l'ADN devrait être relativement insensible aux variations de pH auxquelles doit faire face le lipoplexe lors du trafic intracellulaire. Le BGTC s'est notamment montré efficace pour transférer l'épithélium respiratoire de souris après administration intratrachéale ^[337], ainsi que celui de fœtus de mouton par administration intratrachéale *in utero* ^[132]. Les complexes BGTC/DOPE/ADN se sont également avérés particulièrement adaptés au protocole d'aérosolisation ^[338].

(4) Importance des trois domaines structuraux des lipides cationiques

(a) Partie hydrophobe

Les chaînes hydrophobes, représentant la partie apolaire, peuvent être divisées en trois catégories : simple chaîne, double chaîne et cholestérol. Les lipides à simple chaîne sont le plus souvent des surfactants en raison de leur capacité à former des micelles en solution. Ils sont peu utilisés car d'une grande toxicité. Les lipides à double chaîne sont les plus utilisés, l'acide oléique (C18:1) étant la chaîne insaturée la plus fréquemment retrouvée. Ainsi, la longueur de la chaîne hydrophobe des lipides module leur efficacité de transfection ^[38,339]. De

très nombreuses variations structurales au niveau de la partie hydrophobe ont été testées (variations de la taille, chaînes asymétriques, nombre d'insaturations, sites clivables, ...) [340] mais aucune relation claire entre la structure et la fonction n'a été rapportée, les travaux réalisés étant souvent difficilement comparables en raison de l'originalité des composés et des protocoles *in vitro* et/ou *in vivo* utilisés.

(b) Groupe espaceur

L'espaceur qui relie la tête polaire à la partie hydrophobe peut avoir différentes tailles et être de nature variable (amide, carbamate, ester ou éther). Sa composition a un rôle sur le contact entre la tête polaire cationique et les phosphates de l'ADN, ainsi que sur la biodégradabilité du vecteur [341]. La liaison éther confère une certaine stabilité [342,343] alors que la fonction ester est davantage labile et permet un clivage une fois à l'intérieur de la cellule [341]. Les espaceurs de type carbamate ont été développés pour induire les deux effets simultanément [333,336,344]. Plusieurs stratégies ont été élaborées afin de favoriser le clivage des lipides au niveau de l'espaceur, cela afin de favoriser la libération de l'ADN à proximité du noyau. On peut citer des espaceurs pH-sensibles, photosensibles, réactifs à l'oxydoréduction ou encore dégradables par certaines enzymes [253]. Bien que sa présence soit indispensable, il reste néanmoins difficile d'obtenir des conclusions définitives de l'impact du bras espaceur sur l'efficacité de transfection [345].

(c) Tête polaire

Comme cela a été évoqué précédemment, la tête polaire consiste souvent en une amine tertiaire, un sel d'ammonium quaternaire, un groupement guanidinium. Bien d'autres motifs ont néanmoins été élaborés. La fonction pyridinium du SAINT par exemple, voit sa charge positive délocalisable [346] (Figure 30). Le DOTAU, un composé de type nucléoside, possède quant à lui une fonction uridine permettant d'autres interactions avec l'ADN que les seules interactions électrostatiques (liaisons hydrogènes et π - π *stacking*) [347]. Autre vecteur, le Kana-chol possède une tête polaire aminoglycosidique (dérivée de la kanamycine) présentant plusieurs fonctions amines protonées permettant de lier l'ADN. Ce dernier dérivé a d'ailleurs montré des capacités de transfection intéressantes, notamment sur le tissu pulmonaire *in*

vivo^[348,349]. Comme nous le verrons par la suite, notre groupe a également développé des composés possédant une tête polaire originale, de nature phosphonium ou arsonium.

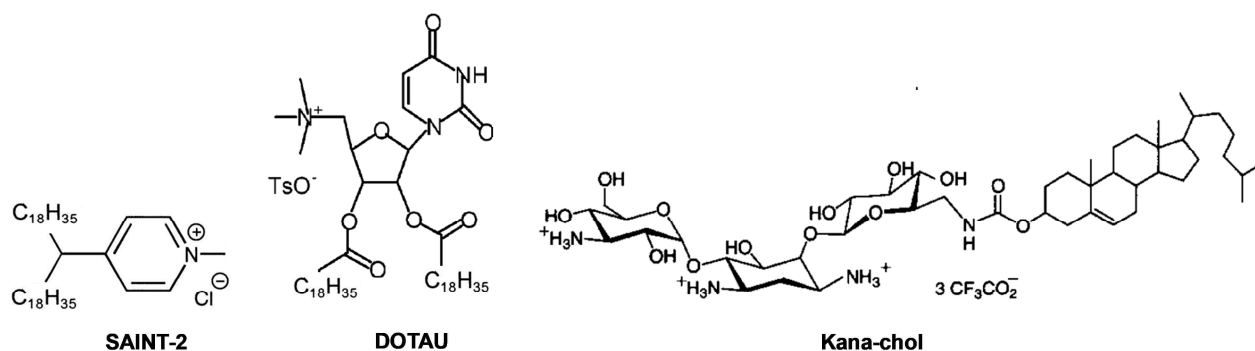


Figure 30: Structures du SAINT-2, du DOTEAU et du Kana-chol

Des études sur les relations structures-activités ont montré que les lipides cationiques avec la plus forte efficacité de transfection partagent les caractéristiques suivantes : une tête polaire cationique deux fois plus courte que la chaîne aliphatique, une liaison éther (3 atomes) entre les chaînes aliphatiques et la partie hydrophile, et une partie hydrophobe constituée de deux chaînes oléiques. Ceci pourrait refléter la nécessité d'une certaine proximité entre les chaînes hydrophobes et la tête cationique dans la formation de complexes avec les acides nucléiques^[350,351].

La densité de charge des complexes influence l'efficacité de transfection, l'idéal étant de permettre une interaction suffisante avec les membranes cellulaires et intracellulaires, sans pour autant menacer l'intégrité des cellules^[253,352]. L'échappement endosomal pourrait à la fois être proportionnel au niveau de protonation des molécules utilisées (voir page 92), mais également à leur densité de charges. Cette dernière serait critique à la formation d'un contact entre les liposomes et les membranes biologiques, précédant leur endocytose ou leur fusion^[353].

La cytotoxicité des complexes lipides cationiques/ADN est fortement liée à la nature cationique des complexes, et par conséquent, à la nature du groupement hydrophile. Par exemple, les amphiphiles contenant un ammonium quaternaire sont plus toxiques que les mêmes composés portant une amine tertiaire, cela venant sans doute de leur plus forte activité inhibitrice de la protéine kinase C, intervenant dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire^[354]. De même, les phosphonolipides dont la charge est portée par un

atome de phosphore ou d'arsenic sont moins toxiques que si la charge est portée par un atome d'azote, qui est moins volumineux ^[351,355]. En effet, l'utilisation d'atomes volumineux a tendance à diminuer la densité de charges, conduisant à une moindre déstabilisation des membranes cellulaires ^[253,356].

(5) Quelques notions concernant la dynamique des lipides cationiques en solution

Les assemblages formés par les lipides cationiques en solution sont appelés liposomes cationiques. En milieu aqueux, l'organisation la plus stable est celle qui permet de minimiser les interactions entre composants hydrophobes et molécules d'eau.

Les liposomes sont classés selon leur taille et leur nombre de bicouches (Figure 31). On distingue les liposomes multilamellaires (MLVs pour *multilamellar vesicles*), les liposomes unilamellaires de petite taille (SUVs pour *small unilamellar vesicles*, 20 à 100 nm), les liposomes unilamellaires de grande taille (LUVs pour *large unilamellar vesicles* ; 100 à 500 nm) et les liposomes géants (GUVs pour *giant unilamellar vesicles* ; 500 nm à 100 µm) ^[357].

Différentes méthodes peuvent alors être utilisées pour obtenir des liposomes unilamellaires (utilisables pour les essais biologiques) à partir de liposomes multilamellaires, l'utilisation d'ultra-sons (sonication) étant sans doute la plus répandue.

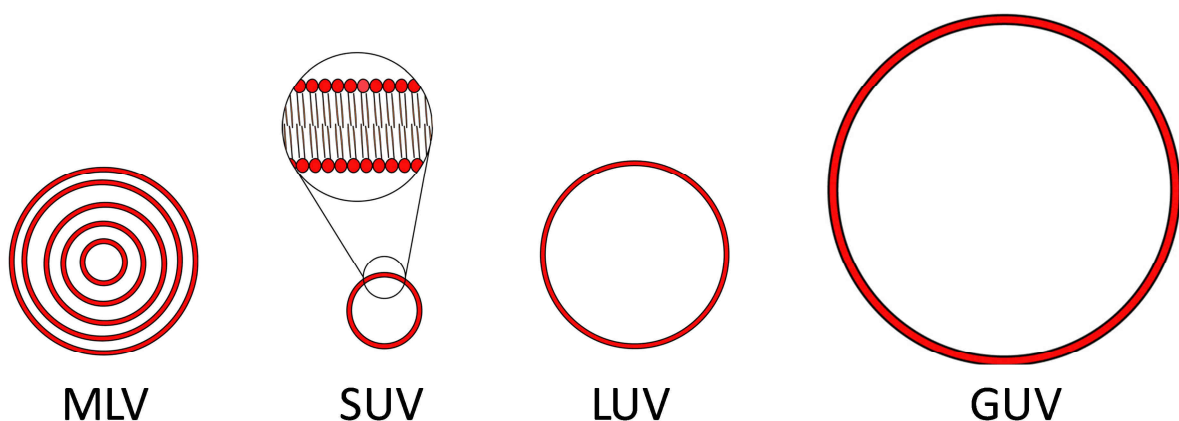


Figure 31 : Représentation schématique des différentes morphologies de liposomes ^[358]

(a) Transition de phase

Les liposomes présentent une organisation et une mobilité différentes selon leur composition et la température du milieu. On observe très schématiquement deux états physicochimiques possibles (Figure 32) :

- La **phase gel L_{β}** : aux températures suffisamment faibles, la plupart des chaînes carbonées des lipides sont en conformation *trans*. Aucune rotation n'est alors possible autour des liaisons C-C des queues apolaires, la chaîne est étirée au maximum et la configuration est alors stable ^[359,360].
- La **phase crystal-liquide L_{α}** est obtenue au-delà d'une température donnée, appelée température de transition. La conformation passe alors d'un état ordonné à un état désordonné (on parle de fluide désordonné). Les chaînes n'étant plus étirées au maximum, on observe une expansion latérale des lipides et une diminution de l'épaisseur de la bicouche. Les bicouches sont alors davantage fluides.

La température de transition de l'état ordonné L_{β} à l'état désordonné L_{α} dépend fortement de la nature des chaînes grasses des lipides cationiques, en particulier de leur longueur et du nombre d'insaturations qu'elles portent ^[361,362].

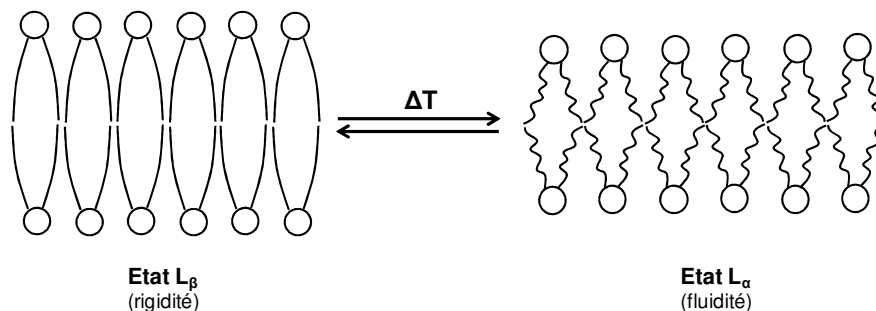


Figure 32: Représentation schématique des différents états physicochimiques de la bicouche lipidique

(b) Organisation supramoléculaire des liposomes et lipoplexes

Différents types d'auto-assemblage sont possibles selon la concentration en lipides, la température, mais également selon la forme géométrique des molécules considérées ^[363-366] (Figure 33). Ainsi, l'encombrement stérique relatif de la tête polaire par rapport à la partie hydrophobe permet d'imaginer plusieurs types d'organisations structurales des liposomes en solution, les principales étant les phases hexagonales et les phases lamellaires (Figure 33).


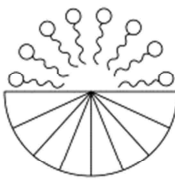

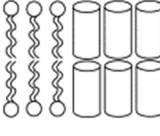

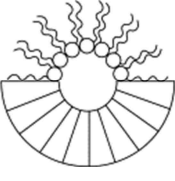
Espèces	Forme	Organisation	Phase
Savons Détergents Lysophospholipides	 Cône inversé	 Micelles	Isotropique Hexagonal 1 (H ₁)
Phosphatidylcholine Phosphatidylsérine Phosphatidylinositol Sphingomyéline Dicétylphosphate DODAC	 Cylindre	 Bicouche	Lamellaire (cubique)
Phosphatidyléthanolamine Acide phosphatidique Cardiolipine Lipide A	 Cône	 Micelles inverses	Hexagonal 2 (H ₂)

Figure 33 : Effet de la forme géométrique des lipides sur la structure des agrégats amphiphiles (modifiée d'après ^[366])

L'organisation des lipides cationiques en solution est profondément modifiée en présence d'ADN plasmidique : les lipides cationiques apparaissent ainsi condensés avec perte de leur contenu aqueux. Il y a un réarrangement des structures reposant sur la fusion des lipides cationiques et la condensation de l'ADN plasmidique ^[367].

Suivant la nature des lipides utilisés, plusieurs types d'organisations structurales des lipoplexes ont été décrits :

- Structure tubulaire (dite « *Spaghetti-like* ») et sphérique (de type « *Meatballs* ») obtenus à partir de lipides unilamellaires qui condense l'ADN sur une surface ^[368]
- Structure multilamellaire (dite de « *Swiss rolls* ») qui donnent des particules sphériques où l'ADN plasmidique est intercalé entre les couches lipidiques d'un lipide multilamellaire ^[369]
- Structure bilamellaire où l'ADN plasmidique est enchâssé entre deux lipides bilamellaires ^[370]
- Structure hexagonale directe ou inverse ^[371].

La phase lamellaire (L_{α}^c) est la structure la plus couramment rencontrée parmi les lipoplexes, l'ADN étant pris en sandwich entre deux bicouches lipidiques (Figure 34). Si certains liposomes, de par leur forme géométrique, forment naturellement des agrégats de phase hexagonale inverse (H_{II}^c) et maintiennent cette structure lorsqu'ils entrent en contact avec l'ADN, l'incorporation de DOPE, elle-même en forme en cône, permet également la formation de ce type d'édifice^[371] (Figure 34).

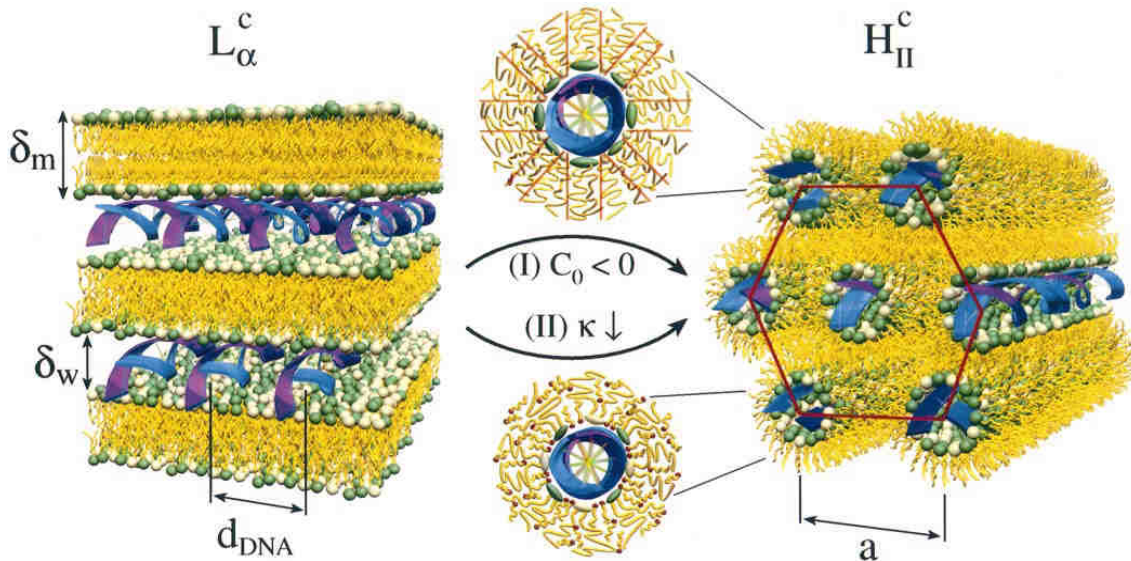


Figure 34 : Ultrastructure des complexes cationiques DOTAP/ADN (lipoplexes). Les hélices d'ADN sont représentées en bleu. Le passage de lipoplexes de phase lamellaire (L_{α}^c ; à gauche) à phase hexagonale inverse (H_{II}^c ; à droite) est ici induit par addition (I) de DOPE (qui est de forme conique) ou (II) d'un mélange de DOPC et d'hexanol (réduisant la rigidité de courbure membranaire)^[371].

Des membranes lipidiques fluides facilitent ainsi la transition d'une phase lamellaire à une phase hexagonale. Une fois à l'intérieur de la cellule, les phases hexagonales inverses sont intéressantes car elles semblent induire une fusion avec les membranes endosomales (caractère dit « fusogène ») et ainsi une meilleure libération de l'ADN à proximité du noyau^[372–376]. Dans les lipoplexes de structure hexagonale directe (H_I^c), l'ADN se trouve alors au niveau des interstices générés par la phase hexagonale, en contact avec les têtes polaires. Le type de structure adoptée peut être observé par diffractométrie de rayons X ou encore par spectroscopie du phosphore 31 (par résonance magnétique nucléaire, RMN).

(c) Organisation macroscopique des lipoplexes

Les lipoplexes sont généralement formés par ajout d'une quantité de lipides cationiques supérieure à celle requise pour neutraliser les charges négatives de l'ADN, ceci dans le but d'obtenir des lipoplexes dont la charge de surface est positive (rapport de charges, ou CR > 1). De cette manière, l'ADN se retrouve totalement complexé, et ainsi protégé des nucléases. Cela permet également d'obtenir une bonne stabilité colloïdale de la formulation par répulsion électrostatique entre lipoplexes. La stabilité colloïdale (stabilité de colloïdes chargés) est en effet déterminée par les forces attractives de Van der Waals et les forces répulsives qui opèrent lorsque des colloïdes chargés s'approchent les uns des autres sous l'effet des mouvements browniens. Enfin, une charge globale positive favorise l'interaction des lipoplexes avec les membranes biologiques chargées négativement.

Deux paramètres macroscopiques liés à la formation des lipoplexes peuvent être caractérisés facilement : la condensation de l'ADN et la taille des lipoplexes.

- La **condensation de l'ADN** par les lipides cationiques peut être évaluée en déterminant son accessibilité à des sondes fluorescentes ayant la propriété de s'intercaler entre les acides nucléiques^[377,378]. La plus utilisée est le bromure d'éthidium (BET) dont la fluorescence augmente d'un facteur 30 une fois intercalé dans l'ADN.

On peut également réaliser une migration électrophorétique sur gel d'agarose afin de déterminer le niveau de complexation/neutralisation de l'ADN^[379]. De part leurs tailles et leur charges globales, les lipoplexes restent dans les puits tandis que seules les molécules d'ADN libres peuvent migrer, intercaler le BET et être ainsi détectées dans le gel.

- La **taille des lipoplexes** est quant à elle le plus souvent déterminée par diffusion dynamique de la lumière.

La Figure 35 illustre les variations physicochimiques caractéristiques qui s'opèrent lors de la formation de lipoplexes à différents CRs (le lipide cationique étant ici une lipopolyamine), mises en évidence à l'aide des techniques évoquées précédemment^[380]. On peut voir qu'il existe trois zones de stabilité colloïdale. La zone A, pour des CRs inférieurs à 1, correspond à un excès de charges négatives. La solution est colloïdalement stable en raison des répulsions électrostatiques, et la taille des particules obtenues se situe entre 100 et 200 nm. L'augmentation du rapport de charges (zone B, CRs entre 1 et 3) conduit à la neutralisation

des charges apportées par le lipide et par l'ADN. Cela conduit à l'agrégation des particules qui deviennent trop grosses (1 à 4 μm) pour être correctement analysées par diffusion de la lumière (Figure 35C). La courbe de fluorescence a atteint un minimum signifiant que l'ADN n'est plus accessible au BET car totalement compacté (Figure 35A). En augmentant à nouveau le CR (zone C), la charge de surface devient positive et les complexes formés redeviennent colloïdalement stables

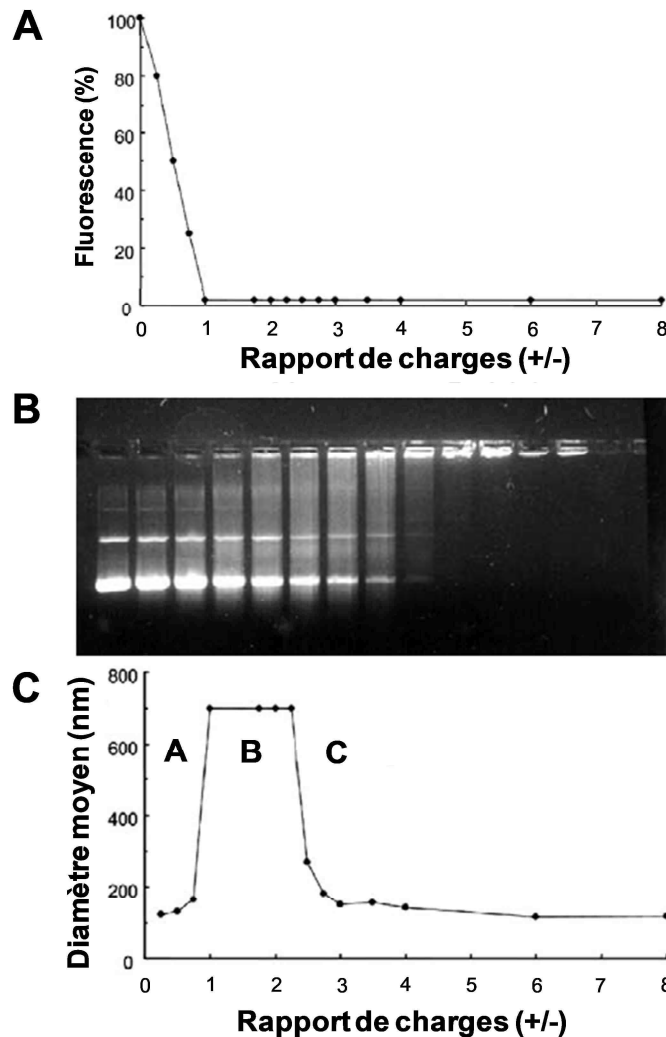


Figure 35 : Caractérisation des paramètres macroscopiques associés la formation de lipoplexes ^[380]. Evaluation du niveau de complexation de l'ADN par mesure de la fluorescence résiduelle du BET (A) et migration sur gel d'agarose (B). (C) Mesure de la taille moyenne des lipoplexes par diffusion de la lumière en fonction du rapport de charges (+/-).

Pour les raisons citées précédemment, les lipoplexes sont le plus souvent formulés en excès de lipides cationiques et appartiennent à la zone C (Figure 35C). C'est également le cas des formulations utilisées dans la majorité de nos études. Il faut néanmoins noter que les problèmes d'agrégation peuvent également apparaître selon des paramètres autres que les proportions lipides/ADN, tels que : la nature du lipide cationique utilisé, le type et la quantité

de colipide associé, la composition des tampons utilisés, la méthode de mélange, la température lors du mélange, la pureté de l'ADN, ou encore le temps écoulé après la formation du complexe ^[381].

V Etapes et mécanismes de transfection par les vecteurs synthétiques

1. Barrières extracellulaires et intracellulaires

Les barrières s'opposant à la délivrance et l'expression d'un gène d'intérêt à l'endroit voulu de l'organisme sont nombreuses et existent aussi bien à l'extérieur de la cellule qu'à l'intérieur de celle-ci (Figure 36). Une fois l'ADN associé au vecteur cationique, le complexe doit pouvoir atteindre le tissu cible à partir du site d'injection, y être internalisé par les cellules cibles, puis l'ADN doit pouvoir transiter jusqu'au noyau pour y être exprimé. Ainsi, le rôle du vecteur est tout d'abord de protéger et compacter l'ADN au cours de ce processus, et permettre de favoriser les différentes étapes clés qui sont successivement : (1) le trafic extracellulaire, (2) l'entrée dans la cellule, (3) la libération de l'ADN à proximité du noyau cellulaire, (4) l'entrée de l'ADN dans le noyau, et (5) l'expression du transgène.

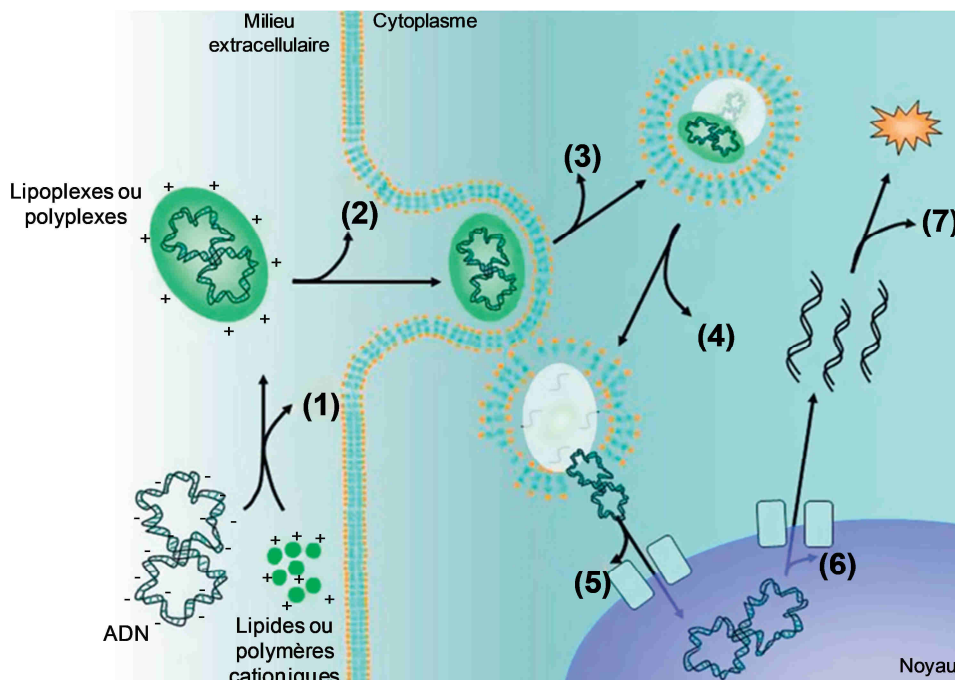


Figure 36 : Barrières à la délivrance non virale de gènes à visée thérapeutique (modifiée d'après ^[382]). (1) Les acides nucléiques peuvent être perdus ou dégradés s'il ne sont pas totalement complexés avec le polymère/lipide cationique; (2) Les complexes peuvent être éliminés avant d'atteindre la surface des cellules cibles; (3) Les complexes fixés à la surface cellulaire peuvent ne pas être internalisés; (4) Après endocytose, une partie de l'ADN peut être dégradée à l'intérieur des endosomes tardifs et des lysosomes; (5) Sorti du compartiment endosomal, l'ADN peut être dégradé par la DNase cytoplasmique; (6) A l'intérieur du noyau, une partie de l'ADN peut ne pas être correctement transcrit ou être mis sous silence; (7) L'ARNm synthétisé à partir du transgène peut ne pas produire de protéine fonctionnelle.

a) Trafic extracellulaire

Dans le cadre d'essais préliminaires *in vitro*, seuls les composants du sérum représentent un obstacle pour les vecteurs synthétiques [383,384]. En revanche, *in vivo*, suivant le mode d'administration, différents paramètres sont capables de limiter le transit des complexes jusqu'aux cellules à corriger. Dans le cadre du transfert de gènes à destination de l'épithélium pulmonaire, l'administration systémique peut ainsi être envisagée, l'obstacle principal étant alors l'endothélium vasculaire difficilement franchissable. L'administration par voie intratrachéale ou par aérosol contourne les barrières endothéliales et semble *a priori* plus adaptée [385]. Nous verrons dans un premier temps les barrières auxquelles doivent faire face les agents de transfert de gènes au niveau des voies aériennes pour une délivrance pulmonaire, puis au niveau de la circulation systémique.

(1) Barrières liées à une délivrance par les voies aériennes

Une fois que l'agent de transfert de gènes a atteint les voies respiratoires, celui-ci peut être piégé par la couche de mucus qui les tapisse et éliminé par le mécanisme de clairance mucociliaire (Figure 37) [386]. Si le complexe n'est pas directement éliminé, il doit être capable de pénétrer un mucus plus ou moins visqueux, de traverser le liquide péri-ciliaire sans être reconnu par les cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes...), d'atteindre la surface cellulaire, et de pénétrer dans la membrane plasmique. Le glycocalyx (complexe composé de glycoprotéines, de glycolipides et de protéoglycanes) peut également empêcher les vecteurs de se fixer à la surface cellulaire.

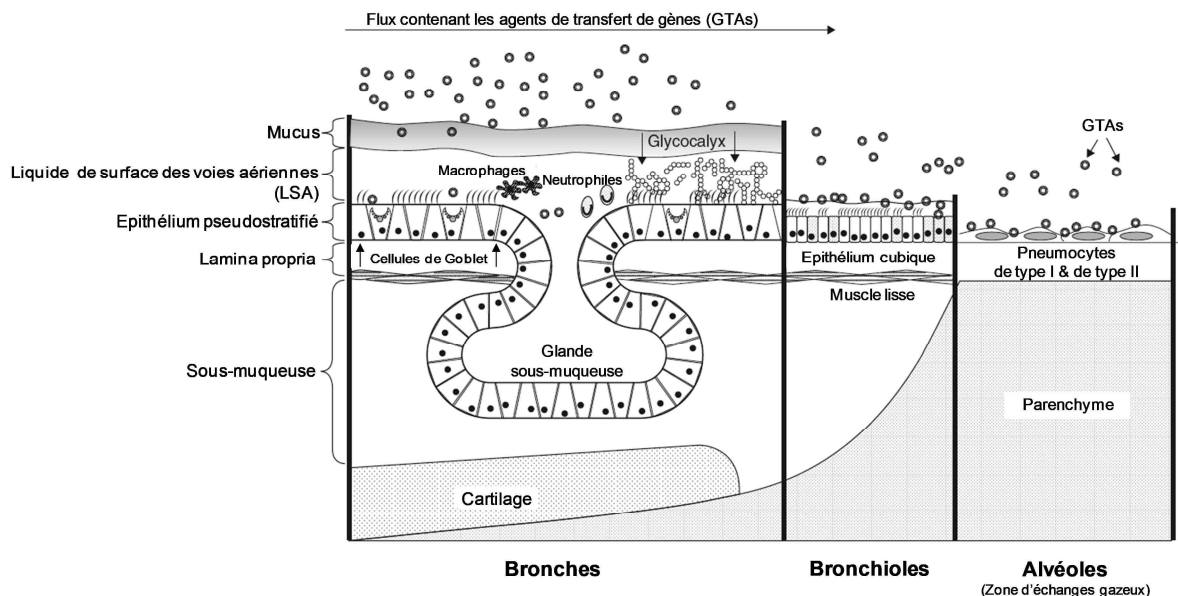


Figure 37 : Barrières à la délivrance de gènes par les voies aériennes (modifiée d'après [122])

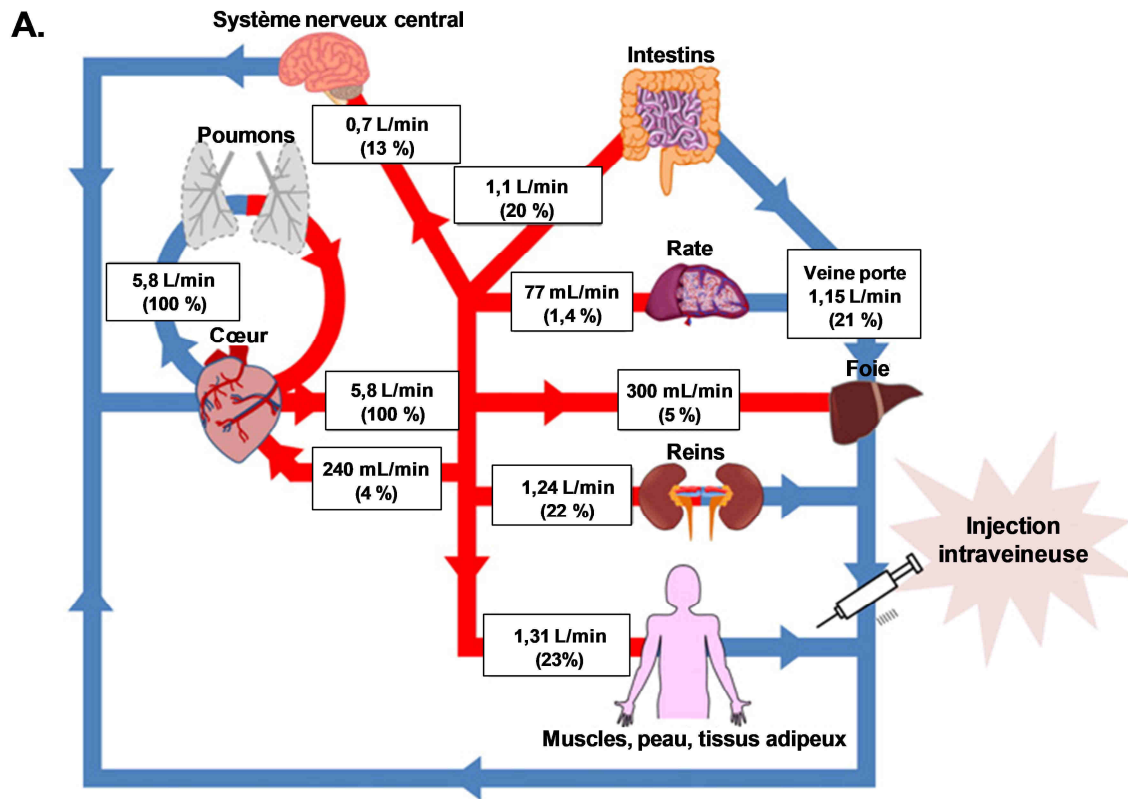
De plus, dans les voies respiratoires de patients mucoviscidosiques, la situation est exacerbée par l'inflammation chronique, l'excès de mucus, ainsi que les sécrétions purulentes contenant des débris cellulaires et bactériens (notamment de l'ADN et de l'actine) pouvant altérer l'intégrité des vecteurs et limiter leur trafic vers les membranes cellulaires^[387]. Etant donné que les jonctions serrées empêchent tout accès à la partie basale des cellules, seule la partie apicale des cellules est en principe accessible aux agents de transfert de gènes. Il a été montré que le franchissement des barrières extracellulaires pouvait être facilité par divers traitements adjuvants, tels que des mucolytiques pour fluidifier le mucus et/ou de la DNase recombinante, ou encore des substances capables de dissocier les jonctions serrées et ainsi permettre aux vecteurs d'accéder à la surface basolatérale qui a un rendement d'endocytose plus important^[387]. Par ailleurs, l'utilisation de fluides viscoélastiques peut, en inhibant la clairance mucociliaire, augmenter le temps de contact des vecteurs avec les cellules et ainsi leur entrée à l'intérieur de celles-ci^[388,389].

(2) Barrières liées à une délivrance par la voie systémique

Lors d'une injection systémique, les complexes doivent circuler assez longtemps pour atteindre les cellules cibles tout en gardant leurs propriétés de transfection. Durant ce trajet, les raisons d'élimination des complexes synthétiques sont nombreuses^[381], les principaux obstacles étant liés à leur instabilité, leur agrégation, et leur tendance à être capturés par le système des phagocytes mononucléés.

(a) Biodistribution

Une fois dans la circulation sanguine, les complexes sont transportés vers le cœur à travers le réseau veineux. En moins d'une minute chez l'homme, la totalité du volume sanguin passe alors par la microcirculation pulmonaire avant d'être distribuée dans les autres tissus (Figure 38).



B.

Organe	Homme (70 kg ; 4 900 mL)			Souris (20 g ; 1,4 mL)		
	Poids (g)	Flux sanguin (mL/min)	Temps d'un cycle sanguin* (min)	Poids (g)	Flux sanguin (mL/min)	Temps d'un cycle sanguin* (min)
Poumons	1 000	5 600	0,9	0,12	8	0,175
Reins	310	1 240	3,9	0,32	1,3	1,1
Foie	1 800	1 450	3,4	1,75	1,8	0,8
Rate	180	77	63,6	0,1	0,09	15,6

* Temps nécessaire pour qu'un volume équivalent au volume total sanguin passe dans l'organe

Figure 38 : (A) Distribution du flux sanguin dans la circulation pulmonaire et dans la circulation systémique. Les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage du flux sanguin total circulant dans chaque organe. (B) Poids des organes les plus irrigués, flux sanguins et temps de cycle chez l'homme et la souris (valeurs issues de ^[390], figure adaptée de ^[391]).

Alors qu'une grande partie des complexes injectés est généralement piégée au niveau du foie (50-60 %), le transgène est majoritairement exprimé au niveau des poumons et de la rate ^[392-394]. Le réseau pulmonaire est en effet composé de capillaires parmi les plus fins du corps humain, avec des diamètres allant de 2 à 13 μm (chez l'homme comme chez l'animal). L'endothélium vasculaire pulmonaire peut ainsi être appréhendé comme un organe en lui-même, d'une surface d'environ 150 m^2 chez l'homme, équivalente à la surface alvéolaire et au moins équivalente à celle de l'endothélium vasculaire systémique ^[395]. De ce fait, des expériences chez le rat montrent que seules les particules inférieures à 3 μm de diamètre

traversent la microcirculation pulmonaire et sont distribuées dans le reste du corps (notamment dans le foie et la rate). Les particules plus grosses restent définitivement bloquées à ce niveau^[396] et peuvent par ailleurs présenter un risque d'embolie pulmonaire^[397]. Si les particules injectées sont chargées positivement, elles vont interagir avec les protéoglycanes, des protéines anioniques particulièrement abondantes à la surface externe des cellules endothéliales pulmonaires^[398]. Les protéoglycanes constituent ainsi une porte d'entrée aux vecteurs cationiques, permettant ensuite leur endocytose^[399]. Si le ciblage passif pulmonaire des nanovecteurs cationiques peut représenter un frein à l'accès à d'autres territoires de l'organisme, celui-ci peut être mis à profit pour délivrer des gènes d'intérêts comme *CFTR* dans le cadre de la mucoviscidose. Dans ce cas, il reste nécessaire de franchir la barrière endothéliale afin d'atteindre l'épithélium alvéolaire.

Comme l'illustre la Figure 39, les vaisseaux sanguins sont constitués de trois couches concentriques : la tunique interne (ou *intima*) formée par l'endothélium et sa membrane basale, la tunique moyenne (ou *media*) composée de cellules musculaires lisses et/ou de fibres élastiques, et la tunique externe (ou *adventice*) constituée de collagène et quelques cellules de soutien. Néanmoins, ces différentes couches sont plus ou moins importantes suivant la nature des vaisseaux.

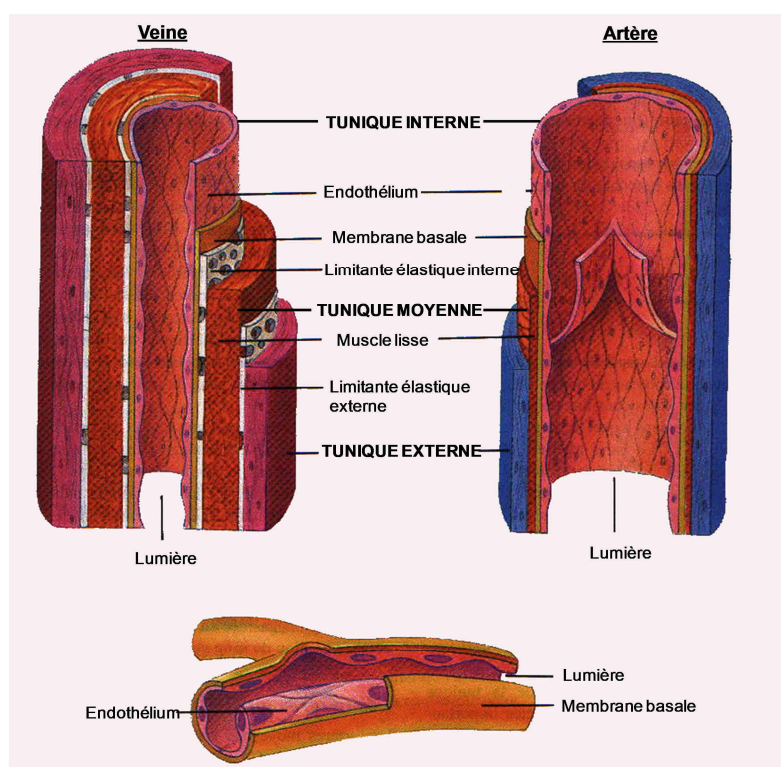


Figure 39 : Constituants tissulaires de la paroi des veines et des artères ^a

^a Source : <http://collettemathieu.blog.lemonde.fr/category/cours-sur-la-rigidite-arterielle/la-rigidite-arterielle/>

Comme cela a été évoqué précédemment, au niveau des alvéoles pulmonaires, la paroi des capillaires est constituée d'un endothélium continu très mince, reposant sur une lame basale qui fusionne avec celle de l'épithélium. Cette proximité limite ainsi le nombre de barrières à franchir pour atteindre les cellules épithéliales. De plus, l'endothélium des capillaires pulmonaires représente une membrane semi-perméable davantage étanche aux solutés qu'à l'eau, qui passe quant à elle relativement librement. Ainsi, après une injection systémique, cette perméabilité devient la principale étape limitante pour le passage de molécules thérapeutiques dans les cellules épithéliales pulmonaires.

(b) Interactions avec les constituants sanguins

Les interactions entre les complexes et les éléments sanguins déterminent en grande partie le devenir des particules injectées. Une fois dans la circulation veineuse, les complexes peuvent tout d'abord interagir avec les opsonines (protéines du complément, immunoglobulines de type IgG et IgM, fibronectine, ...) par interactions hydrophobes^[397,400]. Les macrophages du SPM, qui possèdent des récepteurs spécifiques du fragment Fc des Ig, du fragment C3bi du complément et de la fibronectine, peuvent ainsi procéder à l'élimination des complexes, principalement au niveau du foie (cellules de Kupffer) et de la rate. Ce phénomène s'accompagne souvent d'une réponse inflammatoire.

Au même moment, d'autres protéines sériques anioniques telles que l'albumine, les lipoprotéines (HDL et LDL), la macroglobuline, ou encore l'héparine^[401] peuvent interagir avec les complexes cationiques, modifier à la fois leur diamètre et leur charge (passant de valeurs positives à négatives)^[402], ce qui facilite la prise en charge par le SPM^[383,403]. L'agrégation des lipoplexes dans le sérum augmente également la rétention des particules au niveau pulmonaire^[404]. Les interactions électrostatiques peuvent également déstabiliser les complexes jusqu'à conduire à la libération des acides nucléiques qui vont être à leur tour dégradés par les nucléases. Les acides nucléiques peuvent également induire une réaction inflammatoire *via* leur reconnaissance par le *Toll-like receptor* 3 (TLR3, reconnaissant les ARN double brins)^[405], le TLR7 et le TLR8 (les ARN simple brins)^[406], ou encore le TLR9 (exprimé par les lymphocytes B et les cellules dendritiques plasmacytoïdes, reconnaissant les motifs CpGs des ADN bactériens déméthylés)^[407]. Les recherches sur l'induction de fortes réponses immunitaires peuvent par ailleurs être explorées dans le but de développer des vaccins plasmidiques contre le cancer^[408].

Généralement, l'administration intraveineuse (IV) de complexes cationiques provoque certains effets secondaires transitoires. L'administration intraveineuse de différents types de lipoplexes (tels que le GL67, GL62 (N1-spermine cholesterylcarbamate), DMRIE, ou le mélange DOTMA/DOPE) a par exemple montré une toxicité dose-dépendante chez la souris^[409]. Dans ces expériences, les analyses sanguines mirent en évidence des changements hématologiques et sérologiques caractéristiques de leucopénie et thrombocytopénie profondes, accompagnés d'une cytolysé hépatique.

La réduction de la taille et de la charge des complexes augmente leur « furtivité », c'est-à-dire leur capacité à échapper au système d'élimination des particules étrangères, prolongeant ainsi nettement leur persistance intravasculaire^[410]. L'élaboration de formulations furtives fait le plus souvent appel au recouvrement de la surface des lipoplexes et polyplexes par des chaînes de polyéthylène glycol, créant un réseau hydrophile dense autour des particules qui augmente leur stabilité et leur biodisponibilité. En effet, ce maillage forme une barrière stérique entre les particules et le milieu qui les entoure permettant de limiter les phénomènes d'adsorption ou d'adhérence de constituants sanguins et ainsi de diminuer leur capture par le SPM^[411]. Les complexes furtifs sont néanmoins dans l'incapacité de diffuser à travers la paroi des vaisseaux sanguins, sauf au niveau de certaines tumeurs dont l'endothélium vasculaire est plus perméable. La rémanence vasculaire accrue des vecteurs furtifs peut alors aboutir à leur passage (ou extravasation) sélectif vers le tissu cancéreux à travers l'endothélium vasculaire tumoral^[412]. Ce phénomène, appelé effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) permet ainsi un ciblage passif de tumeurs et des tissus caractérisés par la présence d'une réaction inflammatoire (tissu infecté, maladie auto-immune...)^[413].

Il faut néanmoins noter que le fait de masquer les charges des polyplexes ou lipoplexes se traduit par une réduction des interactions électrostatiques entre les complexes et les cellules, conduisant à une diminution significative des niveaux de transfection obtenus, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*^[414-416]. Il a également été montré que les motifs PEG présentaient un effet délétère sur la sortie des endosomes^[417], conduisant certaines recherches actuelles à l'élaboration de motifs PEG clivables^[418].

b) Le ciblage cellulaire

Comme cela a déjà été évoqué précédemment, notamment lors de la description de certains polymères, des motifs de ciblage peuvent être greffés à la surface des vecteurs synthétiques de façon à ce qu'ils reconnaissent spécifiquement des éléments présents à la surface des cellules cibles. Cette stratégie découle du concept de « *magic bullet* » introduit par Paul Ehrlich, prix Nobel de médecine (1908), désignant un médicament qui pourrait différencier spécifiquement les cellules saines de celles à traiter. Ces éléments de ciblage peuvent être des anticorps, des peptides, des aptamères ou de petites molécules ayant une affinité pour un motif exprimé à la surface de la cible thérapeutique.

Le ciblage des récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPR, reconnaissant les motifs galactose et lactose) présentes sur les **hépatocytes** à l'aide de motifs ASGP greffés sur des poly-L-ysines a été le point de départ de la stratégie de ciblage par des vecteurs non viraux^[239]. De très nombreux travaux ont été ensuite menés afin de trouver la formulation la plus adaptée aux cellules cibles. On peut citer une étude récente qui a montré des résultats encourageants concernant le ciblage des hépatocytes en utilisant le dendrimère PAMAM conjugué à une cyclodextrine (oligosaccharide cyclique provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon) portant un motif lactose^[419], l'objectif étant alors double : cibler une population cellulaire tout en augmentant la biocompatibilité grâce à la cyclodextrine. Les lipoprotéines LDL (*Low-Density Lipoprotein*) permettent également de cibler les hépatocytes, à l'inverse des HDL (*High-Density Lipoprotein*) qui ciblent également les intestins, les reins et les organes stéroïdogènes^[420]. Les motifs PEG dits « réversibles », ayant la propriété d'être clivés à l'intérieur des endosomes (soit grâce à une fonction pH-sensible, soit par insertion d'une fonction clivable par les enzymes lysosomales) ou encore d'être éliminés au fil du temps (e.g. PEG-céramides), ont par ailleurs démontré une capacité à être fixés par les protéines ApoE constitutives des lipoprotéines, conduisant ainsi à un ciblage indirecte des hépatocytes^[421].

Le **tissu pulmonaire** présente l'avantage d'être accessible à la fois par voie intraveineuse et par voie locale. La plupart des travaux de ciblage porte sur la recherche de ligands situés au pôle apical des cellules épithéliales. Les principales cibles sont : le récepteur purinergique P2Y2 à l'aide du ligand UTP^[422] ; le récepteur de l'urokinase (système d'activation du plasminogène) avec un peptide contenant le motif CLNGGTC^[423], le récepteur du complexe serpine-enzyme (SecR) à l'aide d'un peptide possédant la séquence CSIPPEVKFNKPFVYLI^[424], les récepteurs de

la lactoferrine à l'aide de lactoferrine^[425], la molécule d'adhésion intercellulaire ICAM-1 (récepteur des pathogènes respiratoires rhinoviraux^[426]) à l'aide de la séquence peptidique SERSMNF^[427], ou encore les lectines membranaires par l'intermédiaire de motifs lactose^[428,429].

La majorité des travaux de ciblage reste néanmoins consacrée à la conception de **vecteurs ciblant les cellules cancéreuses**, ces dernières présentant souvent l'avantage de surexprimer certains récepteurs membranaires particuliers. Ainsi, les recherches s'orientent principalement sur le ciblage : des récepteurs à l'acide folique (surexprimés dans la plupart des cancers) avec des motifs folates^[430,431] ; des récepteurs à activité tyrosine-kinase tels que ceux des facteurs de croissances épidermiques (EGFR, tel que HER2) et vasculaires (VEGFR), à l'aide des ligands de mêmes noms, d'anticorps humanisés ou encore de certains oligopeptides^[432,433] ; les récepteurs σ (particulièrement exprimés à la surface des cellules cancéreuses pulmonaires) avec des motifs chimiques de types anisamides^[434] ; les intégrines (pour cibler les cellules de la vascularisation tumorale) à l'aide motifs RGD^[435].

Quelque soit le ligand utilisé, il convient généralement de le greffer à l'extrémité d'une chaîne PEG, de sorte à ce qu'il soit suffisamment externalisé pour être accessible à sa cible.

c) Trafic intracellulaire

(1) L'entrée dans la cellule : les voies d'endocytose

La plupart des complexes synthétiques ont une taille allant de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres. De ce fait, ces particules ressemblent à celles naturellement retrouvées dans l'organisme (telles que les bactéries ou les virus) et peuvent ainsi entrer en contact avec la cellule d'une manière similaire. Globalement, l'endocytose assure une perméabilité cellulaire sélective et contribue à la nutrition cellulaire, à la constitution de réserves, mais également à l'épuration de l'organisme. Selon la taille des particules ainsi que la nature des protéines intervenant dans le processus d'internalisation, on distingue plusieurs voies d'internalisation cellulaire (Figure 40) dont seules les principales seront décrites ici : la phagocytose, la voie clathrine-dépendante, la voie cavéole-dépendante, et la macropinocytose^[436,437]. Des voies d'endocytose indépendantes de la clathrine et de la cavéoline ont également été décrites, mais seulement quelques études font état de leur implication dans l'internalisation d'agents de transferts de gènes^[438,439].

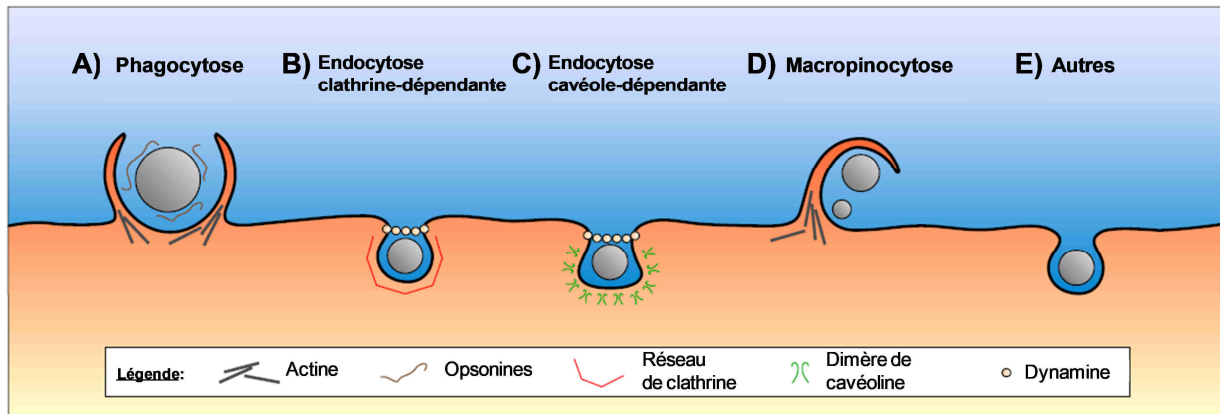


Figure 40 : Principales voies d'entrée des vecteurs dans les cellules mammifères (modifiée d'après ^[436])

La **voie clathrine-dépendante** est la voie la mieux caractérisée, et également celle privilégiée concernant l'entrée des vecteurs. Elle nécessite de l'énergie et implique un réseau de clathrine (Figure 40B). Ce type d'endocytose démarre par la reconnaissance spécifique des molécules au niveau de la surface cellulaire, les complexes ligand/récepteur étant alors internalisés par la formation de puits dits « mantelés ». La fermeture et le détachement de la vésicule de la membrane plasmique (vésicule mantelée d'un diamètre d'environ 100 nm) sont induits par la phosphorylation de la dynamine. La vésiculation s'accompagne dès lors de l'activation d'une ATPase à proton (V-ATPase pour *Vacuolar-type H⁺-ATPase*) responsable de l'acidification de la lumière de la vésicule ainsi que de la perte du manteau de clathrine. On observe alors la formation de vésicules lisses qui vont fusionner pour former les premiers endosomes dits « précoces ». Les molécules internalisées sont ensuite transférées dans les endosomes tardifs puis dans les lysosomes. Un gradient de pH s'établit 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 ^[440], tout cela dans un intervalle de 40 à 60 minutes ^[441]. Le trafic vésiculaire est contrôlé par les protéines rab (GTPases) qui sont spécifiques de chaque type de vésicule, les protéines rab5 pour les endosomes précoces et les protéines rab7 pour les endosomes tardifs.

La seconde voie d'endocytose faisant appel à la formation de vésicules est la **voie cavéole-dépendante** (Figure 40C). Les cavéoles sont des invaginations sans clathrine, le réseau de clathrine étant remplacé par un réseau de cavéoline. Les cavéoles sont présentes en particulier dans des îlots lipidiques riches en cholestérol et sphingolipides, majoritairement présents à la surface des cellules endothéliales.

La **phagocytose**, particulièrement utilisée par les macrophages, monocytes et neutrophiles pour éliminer les structures infectieuses, abîmées ou sénescents, concerne principalement les particules de grandes tailles préalablement opsonisées (Figure 40A). Cependant, ce mode d'internalisation existe également dans les cellules endothéliales (HUVEC) et les cellules épithéliales pulmonaires^[442]. La phagocytose permet leur internalisation par exvagination des membranes grâce aux filaments d'actine.

La **macropinocytose** permet l'internalisation de particules plus petites que celles prises en charge par la phagocytose. Les vésicules formées (appelées « macropinosomes ») sont hétérogènes, avec des diamètres variant entre 0,5 et 5 µm (Figure 40D). Ce mécanisme est particulièrement développé par les cellules dendritiques et les macrophages.

Les complexes composés des vecteurs synthétiques et d'acides nucléiques, pour la plupart chargés positivement, seraient préférentiellement internalisés par la voie d'endocytose clathrine-dépendante ou par celle dépendante des cavéoles. Cela ferait suite à leurs interactions électrostatiques avec des macromolécules anioniques présentes sur la face externe de la membrane plasmique telles que les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes^[443,444].

(2) La sortie de l'endosome

L'inefficacité relative des vecteurs synthétiques par rapport aux vecteurs viraux est probablement liée à ce moment crucial du transfert de gènes. En effet, si une forte internalisation des complexes est souvent observée, il apparaît que la plus grande partie d'entre eux est piégée puis dégradée au niveau endosomal, seule une infime fraction parvenant à gagner le cytosol^[445]. Etant donné que la maturation endosomale s'accompagne d'une acidification interne de l'organelle, des stratégies permettant d'exploiter ce phénomène ont été imaginées afin de faciliter la sortie des complexes.

(a) Cas des polyplexes

Les polymères tels que la PEI et le PAMAM utilisent le pouvoir tampon des amines secondaires protonables pour contrecarrer l'acidification endosomale (due à l'action d'une ATPase à protons). Il a d'ailleurs été observé que le remplacement des amines protonables par des amines quaternaires, non protonables, diminuait de 20 fois les capacités de transfection de la PEI ^[446]. Ce pouvoir tampon, appelé « éponge à protons » ^[275], faisant passer la polyamine de 20 à 45 % de protonation entre les pH 7 et pH 5 respectivement ^[447], entraîne une entrée massive d'ions chlorure à l'intérieur des vésicules ^[448]. L'importante augmentation de la concentration ionique à l'intérieur des endosomes s'accompagne d'une entrée conséquente d'eau (par simple phénomène osmotique), entraînant un gonflement de l'endosome et, *in fine*, la rupture des membranes et la libération de l'ADN à proximité du noyau ^[275,448-451] (Figure 41).

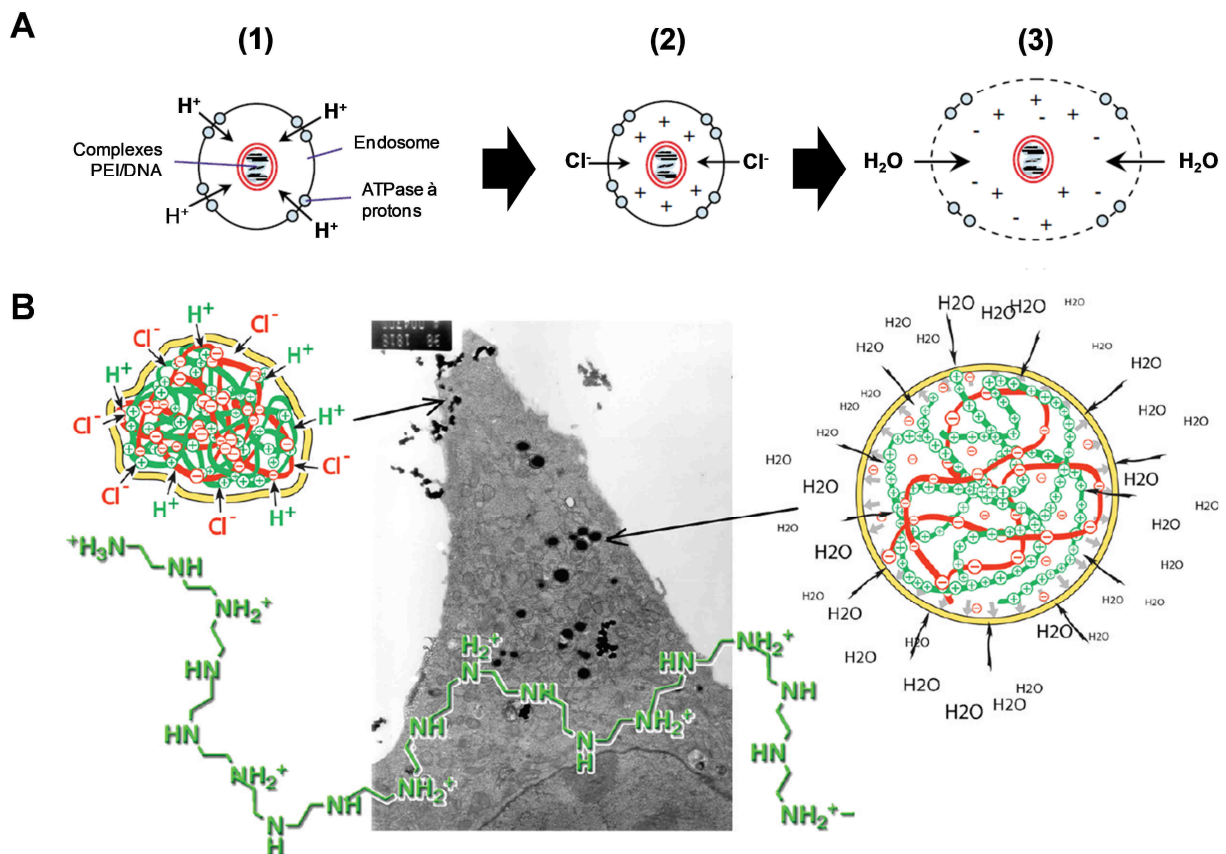


Figure 41 : (A) Mécanisme schématisé du phénomène d'éponge à protons (modifiée d'après ^[452]). (B) Observation par microscopie électronique à transmission du grossissement et de la sphérisation des vacuoles contenant la PEI (en vert) associée à l'ADN (en rouge) ^[453]

Il est également possible de créer un effet éponge à protons en utilisant l'histidine dont le noyau imidazole est protonable à pH inférieur à 6. Ainsi, le greffage de 90 résidus d'histidine

sur la poly-L-Lysine (de 190 résidus lysine) permet par exemple d'augmenter très fortement l'efficacité de transfection de la PLL nue^[255]. Tout comme pour la PEI, l'addition de bafilomycine A₁, un inhibiteur de la pompe à protons endosomale, diminue fortement l'efficacité de transfection de la PLL histidinylée, montrant l'importance de l'effet tampon de ces composés. Depuis, de nombreux polymères et peptides contenant des résidus histidine ou imidazole ont été synthétisés, notamment une PEI linéaire dont la substitution par des résidus histidine diminue fortement la toxicité *in vitro* tout en gardant la même efficacité de transfection^[454].

(b) Cas des lipoplexes

Concernant les lipoplexes, l'échappement de l'ADN des endosomes serait provoqué par un phénomène dit de « flip-flop » des lipides de la membrane endosomale^[401]. La formation de paires d'ions entre les lipides cationiques des lipoplexes et les lipides anioniques membranaires conduirait à la déstabilisation des lipoplexes et, au final, à la libération de l'ADN dans le cytoplasme (Figure 42).

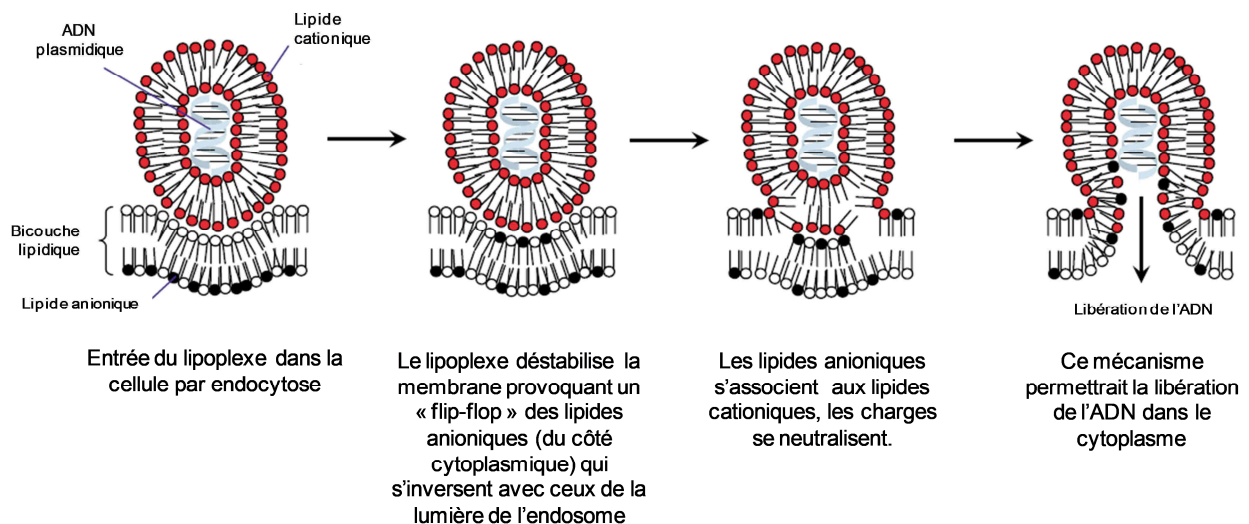


Figure 42 : Représentation schématique de la libération de l'ADN des endosomes par « flip-flop » (modifiée d'après^[452])

Pour favoriser l'échappement endosomal des lipoplexes, de nombreuses stratégies ont été développées :

- L'ajout de **DOPE** pour favoriser la formation de phases hexagonales inverses, ou plus globalement, l'élaboration de lipides adoptant naturellement ce type de structure fusogène.
- L'utilisation de **peptides fusogènes**, d'origine virale ou synthétique, capables d'induire la fusion ou la lyse des endosomes^[455–457]. On peut citer les peptides anioniques dérivés du virus de l'influenza tels que l'IFN7 (GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG) ou le E5CA (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCA) qui ont permis d'augmenter les efficacités de transfection des lipoplexes^[458–460] et polyplexes^[258,461], ou encore le peptide synthétique GALA (Glu-Ala-Leu-Ala), mimant les séquences des protéines virales de fusion, qui change de structure lorsque le pH diminue de 7 à 5 et induit la déstabilisation des membranes endosomales^[462].
- Le développement de **liposomes acido-sensibles**, stables à pH physiologique mais qui ont la particularité de déstabiliser les bicouches lipidiques et d'acquérir des propriétés fusogènes en milieu acide^[463]. On peut ici citer le groupement imidazole, largement étudié pour augmenter la fusogénicité des systèmes lipidiques^[325,464–466] et polymériques^[454]. L'incorporation de motifs PEG clivables à pH 5 dans des systèmes lipidiques s'est également montrée intéressante pour augmenter la sortie endosomale^[467].

d) Le routage intracellulaire du plasmide et l'entrée dans le noyau

A l'exception des ARN interférents qui ont une cible cytoplasmique, la translocation des acides nucléiques dans le noyau représente l'étape ultime avant la transcription du message génétique apporté à la cellule. En réalité, peu d'informations existent sur le devenir exact de l'ADN nu ou complexé, à sa sortie de l'endosome. Il a été montré qu'il fallait 2 heures pour que l'ADN nu soit dégradé à l'intérieur du cytoplasme, et 4 heures pour que 25 % de l'ADN associé à des lipides cationiques soit détruit^[468]. Cela illustre la nécessité de comprendre cette étape du transfert de gènes afin de trouver les moyens adéquats pour maintenir l'intégrité des gènes thérapeutiques.

Très tôt, il a été montré que la micro-injection intranucléaire de lipoplexes, à l'inverse de l'ADN nu, ne permettait pas d'obtenir une expression du transgène dans les cellules traitées^[469]. Il a par conséquent été établi que l'ADN devait arriver sous forme libre dans le

noyau pour pouvoir être accessible à la machinerie transcriptionnelle. Plus récemment, d'autres expériences ont remis en question ce concept en montrant que l'ADN pouvait être accessible aux enzymes de transcription, alors qu'il était encore complexé à la PEI^[450]. Toujours est-il que les cellules en division sont plus facilement transfectables que les cellules quiescentes, le transfert de matériel génétique vers le noyau étant facilité par la rupture de la membrane nucléaire pendant la mitose (entre les phases G2/M et la phase G1 du cycle cellulaire suivant)^[470,471]. Cependant, lorsque l'enveloppe nucléaire est présente, la seule porte d'entrée du noyau est le pore nucléaire (ou NPC pour *Nuclear Pore Complex*)^[472] qui permet la diffusion passive des petites molécules (<60 kDa) et le transport actif des plus grandes. Si les petites molécules d'ADN sont capables de traverser les pores nucléaires, celles d'une taille supérieure à 2 kb restent localisées dans le cytoplasme^[473]. Une diminution de la diffusion des fragments nucléiques, inversement proportionnelle à leur taille, a pu être observée à l'intérieur du cytosol (les grands fragments étant davantage freinés). Néanmoins, celle-ci était abolie en rompant le cytosquelette d'actine^[474]. L'importance du cytosquelette a également été rapportée récemment après transfert de gènes par électroporation, présentant cette fois-ci un effet bénéfique sur la transfection, sans doute en facilitant l'invagination de la membrane cellulaire nécessaire à l'entrée des acides nucléiques dans la cellule^[475].

Après transfection à l'aide de lipides ou de polymères, et en fonction de la quantité d'ADN complexé, on estime qu'entre 2 000 et 100 000 copies plasmidiques peuvent être délivrées à l'intérieur de chaque cellule^[476]. En fonction du type cellulaire et du mode de détection (qPCR, *southern blot*, microscopie électronique), on estime que seuls 1 à 10 % des plasmides délivrés dans la cellule atteignent le noyau et sont finalement transcrits^[477]. Même si l'ADN n'est plus complexé au vecteur cationique à l'intérieur du cytoplasme et/ou du noyau, il semble néanmoins peu probable que ce dernier soit maintenu sous forme totalement libre, en raison des multiples protéines de liaison à l'ADN (polyamines et autres polycations) présentes dans les différents compartiments cellulaires^[478]. L'étude des interactions pouvant intervenir au niveau cytosolique est par conséquent d'un grand intérêt afin de pouvoir, dans le futur, utiliser la machinerie cellulaire de façon optimale et favoriser le trafic intracellulaire.

Il a récemment été montré que l'import nucléaire des plasmides (*via* les NPC) était un processus séquence-spécifique, faisant intervenir des éléments eucaryotes appelés DTSs (*DNA Nuclear Targeting Sequences*)^[479]. Ainsi, quelques 72 pb de l'*enhancer* SV40 insérées sur un plasmide suffisent à permettre son entrée dans le noyau cellulaire, le plasmide contrôle

restant séquestré dans le cytoplasme jusqu'à une éventuelle division cellulaire. La séquence nucléotidique en question, nommée SV40 DTS, a par ailleurs prouvé son efficacité sur tous les types cellulaires testés (lignées et cultures primaires), d'origine animale et humaine ^[478]. Cet import nucléaire sélectif fait intervenir des facteurs de transcription (FT) qui vont reconnaître et se fixer aux DTS à importer. Les FT possèdent des signaux de localisation nucléaire (NLSs pour *Nuclear Localization Signals*), des séquences peptidiques fortement basiques qui, si elles sont accessibles, peuvent être reconnues par des protéines de la famille des importines dont le rôle est de faire transiter les FT et séquences nucléiques associées vers l'intérieur du noyau ^[478] (Figure 43).

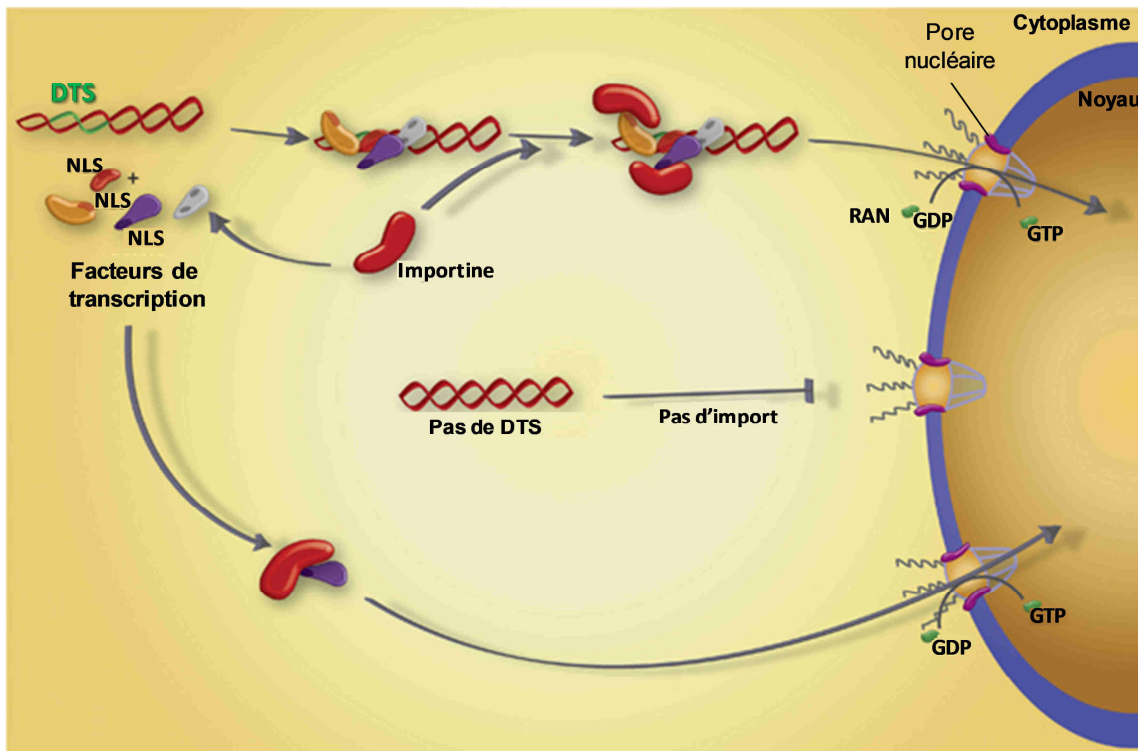


Figure 43 : Import nucléaire (modifiée d'après ^[478]). Les facteurs de transcription et autres protéines nucléaires peuvent entrer dans le noyau grâce à des interactions entre leurs séquences NLSs et des protéines de la famille des importines. Cependant, si les plasmides se retrouvent dans le cytoplasme, et qu'ils contiennent des séquences DTS servant d'échafaud pour des facteurs de transcription et d'autres protéines de liaison à l'ADN, ils peuvent former des complexes avec ces protéines, et par là attacher les NLSs à l'ADN. Certains des NLSs peuvent être en conformation permettant une interaction avec les importines ce qui conduit au transport du complexe ADN-protéine à l'intérieur du noyau *via* le pore nucléaire.

Comme certains facteurs de transcription ne sont exprimés que dans certains types cellulaires, les recherches se portent sur l'identification de DTS pouvant être spécifiquement liées à de tels FT, de façon à générer un nouveau moyen de ciblage cellulaire. De cette manière, des DTS spécifiques des cellules endothéliales, des cellules épithéliales alvéolaires de type II et des cellules de muscles lisses ont pu être identifiées ^[480,481].

D'autres séquences DTSs peuvent faciliter l'entrée dans le noyau en l'absence de division cellulaire. Les séquences DTSs les plus étudiées restent celles capables de se lier au facteur de transcription anti-apoptotique NF- κ B (*Nuclear Factor-kappaB*). La répétition de motifs 3NF, des séquences composées de trois répétitions de 10 pb ayant une forte affinité de fixation au NF- κ B, placés en amont et en aval de la cassette d'expression du transgène, permet par exemple d'augmenter le niveau d'import nucléaire en comparaison à un plasmide contrôle^[482]. Néanmoins, les avis et résultats obtenus par les différentes équipes sont comme souvent partagés^[483]. A noter également que la stratégie initiale, et sans doute la plus largement explorée, est de coupler directement des peptides NLS synthétiques à l'ADN ou au vecteur synthétique, mais les résultats obtenus jusqu'à présent demeurent contrastés.

S'il est globalement admis que l'ADN se dissocie du vecteur cationique avant son entrée dans le noyau, plusieurs groupes ont observé que celui-ci pouvait également se retrouver sous forme complexé dans le compartiment nucléaire, notamment avec la PEI^[482,484,485]. Ces résultats suggèrent qu'il existerait des voies indépendantes des importines permettant l'entrée nucléaire. Davantage d'études mécanistiques demeurent nécessaires afin de mieux cerner, en fonction du type de vecteur utilisé, les conditions de libération de l'ADN à l'intérieur de la cellule, ainsi que les éléments pouvant favoriser ou freiner son transport dans le noyau et sa prise en charge par la machinerie transcriptionnelle.

e) L'expression du transgène

Encore récemment, les efforts se concentraient essentiellement sur la construction d'un « vecteur idéal » capable de franchir toutes les barrières physiologiques rencontrées sur le trajet menant aux cellules cibles, et d'y délivrer spécifiquement des acides nucléiques thérapeutiques. Pourtant, la composante génétique est elle aussi déterminante car son expression conditionne finalement le phénotype attendu. Comme nous venons de le voir, certaines séquences nucléiques peuvent favoriser le transport nucléaire, mais la construction globale du plasmide a un rôle de tout premier plan sur le niveau et la durée d'expression du transgène d'intérêt^[235].

Tout plasmide est généralement composé d'une cassette d'expression (CE) et d'un « *backbone* » bactérien (BB). La CE est l'unité transcriptionnelle contenant le(s) gène(s) d'intérêt ainsi que les séquences régulatrices permettant une expression dans les cellules de mammifères. Le BB permet l'amplification des plasmides à l'intérieur de bactéries, et contient généralement un gène de résistance à un antibiotique et une origine de réplication bactérienne ^[486] (Figure 44).

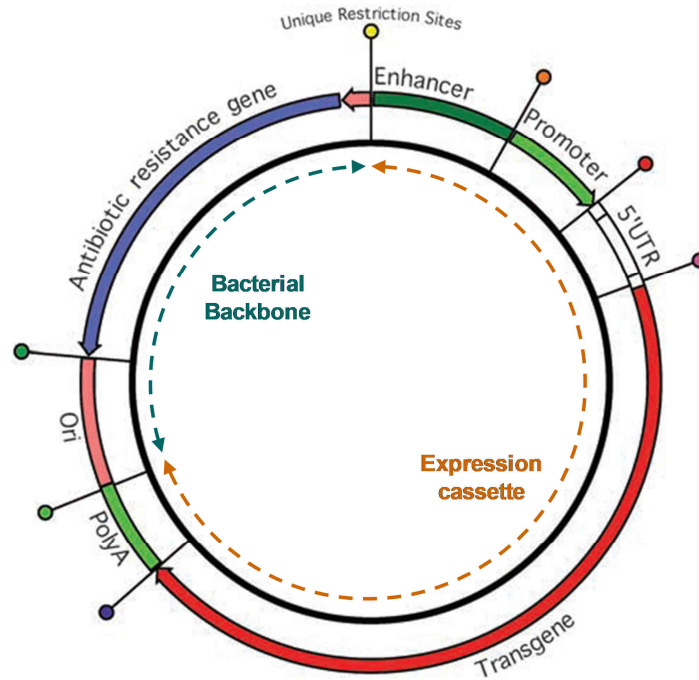


Figure 44: Les différentes composantes d'un plasmide « classique » (modifié d'après ^[235])

Comme les séquences bactériennes n'interviennent pas dans l'expression du transgène et que celles-ci pourraient même représenter un danger chez l'homme (aussi bien en termes de dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques que d'induction de réponses immunogènes et inflammatoires), une approche consiste à générer, par recombinaison spécifique de sites chez *E. coli*, des minicercles ne contenant que les éléments nécessaires à l'expression du transgène. Bien qu'ayant montré son efficacité *in vivo* ^[487], cette méthode est compliquée à mettre en place car les efficacités de recombinaison et de purification sont souvent relativement faibles.

Concernant la qualité des acides nucléiques utilisés lors des études précliniques et cliniques, il est indispensable d'utiliser un ADNp (i) sous forme majoritairement superenroulée, (ii) de très grande pureté, c'est-à-dire avec un minimum de contaminants (tels que de l'ADN, ARN ou

protéines bactériennes), et (iii) avec des caractéristiques physicochimiques stables dans le temps^[488]. De façon curieuse et inexplicée, il a été montré que des mêmes plasmides, produits par différents fabricants respectant toutes les recommandations officielles (concernant le niveau d'endotoxines et l'état topologique super-enroulé), pouvaient tout de même procurer des efficacités de transfection très différentes au niveau des poumons de souris^[235]. Au niveau de la circulation sanguine, l'ADN nu comme l'ADN complexé a tendance à passer d'une forme superenroulée à une forme circulaire ouverte, plus apte à être reconnue et dégradée par les nucléases cytosoliques. Afin de limiter ce phénomène, certaines séquences telles que les queues polyA de l'hormone de croissance bovine (BGH) ou celles du SV40 peuvent être utilisées, permettant de rallonger la demi-vie du plasmide sous forme superenroulée dans les lysats cellulaires, dans le plasma de souris, ou encore lors d'un stockage à 4°C^[489].

Le problème majeur rencontré dans la plupart des expériences de transfert de gènes non viral sur modèles animaux est la courte durée d'expression du transgène. En effet, si le plasmide n'est pas capable de se répliquer ou de s'intégrer dans le génome de la cellule-hôte, il sera perdu par les cellules-filles au cours des divisions cellulaires successives. Cependant, même dans la configuration où l'ADNp peut en principe être maintenu sous forme d'épisome (extrachromosomal) durant toute la durée de vie de la cellule (cellules se divisant lentement ou parfaitement différenciées), l'expression du transgène peut tout de même être inactivée. Il a été montré lors d'expériences *in vivo* que le plasmide pouvait être présent dans le noyau des cellules sans que celui ne soit exprimé, éliminant l'hypothèse d'une destruction des cellules contenant le transgène^[235]. Le promoteur apparaît être impliqué dans ce phénomène de silençage tout comme les éléments du BB.

Dans le but d'obtenir une forte expression ubiquitaire du transgène, l'utilisation de promoteurs viraux a largement été étudiée *ex vivo* et *in vivo*^[235]. Afin d'amplifier leur niveau d'expression, différents *enhancers* ont été ajoutés à proximité du promoteur permettant d'obtenir un pic d'expression encore plus fort^[490,491]. Cependant, l'expression de transgènes sous contrôles de promoteurs viraux tels que celui du cytomégalo virus (*Immediate Early Promoter* (IEP)-CMV) est rapidement perdue, après avoir généralement atteint un pic d'expression un à deux jours après la transfection^[492-494]. Une raison majeure à ce phénomène viendrait du silençage épigénétique de la région promotrice lié à présence de nombreux motifs CpGs, dont les cytosines subiraient une méthylation à l'intérieur des

cellules^[495,496]. Au delà de cela, l'inflammation qu'induisent les CpGs suite à leur reconnaissance par les TLR9 à l'intérieur des endosomes^[497] aurait également un rôle dans le silençage du transgène^[498–501]. Les résultats obtenus au niveau pulmonaire montrent également que l'élimination des CpGs de l'ADNp permet d'augmenter le niveau et de la durée d'expression du transgène^[289,502]. Si l'utilisation de promoteurs viraux est encore largement étudiée, les études actuelles se portent plutôt sur l'utilisation de promoteurs ubiquitaires ou tissus-spécifiques. L'utilisation du promoteur humain de la polyubiquitine C (Ubc) a, par exemple, permis d'obtenir une expression pulmonaire soutenue après électroporation d'ADN nu^[232], ainsi qu'après aérosolisation de complexes synthétiques chez la souris^[502]. Le remplacement de l'*enhancer* du cytomégalovirus (CMV) murin par sa version humaine aux côtés d'une version délétée de tout motif CpG (CpG-free) du promoteur du facteur d'élongation 1 α (EF1 α), a par ailleurs prouvé toute son utilité en permettant d'obtenir un niveau d'expression du transgène soutenu au niveau pulmonaire (chez la souris)^[235,289,502].

Cependant, certains auteurs présentent des résultats contrastés concernant le rôle des motifs CpGs dans le silençage, préférant mettre en avant la formation d'hétérochromatine (forme transcriptionnellement inactive de l'ADN, à l'inverse de l'euchromatine) au niveau du BB, qui s'étendrait à la CE et empêcherait l'accessibilité aux facteurs de transcription^[503]. Dans ce travail, les auteurs ont également montré que l'injection hydrodynamique d'un plasmide dépourvu de BB conduisait à une expression hépatique du transgène plus longue que le plasmide équivalent, possédant les séquences bactériennes. Par ailleurs, l'apport du BB en *trans* ne conduisait pas au silençage de la cassette d'expression, illustrant ainsi la nécessité que les deux éléments (CE et BB) soient liés de façon covalente pour exercer un tel effet^[503].

Une autre stratégie destinée à éviter la mise en silence transcriptionnelle, est d'incorporer des régions d'ancrage appelées S/MAR (*Scaffold/Matrix Attachment Regions*) riches en adénine et en thymine ($\approx 70\%$) qui semblent jouer plusieurs rôles importants dans les fonctions de la chromatine, notamment au niveau de l'organisation spatiale et temporelle de l'expression génique. L'insertion de telles séquences dans un plasmide conduit à augmenter l'expression du transgène dans différents organes, à empêcher le silençage, et à promouvoir la réplication du plasmide^[504]. Néanmoins, des niveaux et durées d'expression similaires ont pu être atteints sans l'utilisation de ces séquences.

Il est à noter que les systèmes de plasmides dits « intégratifs » ont également été largement étudiés, principalement à destination de cellules ayant un taux élevé de divisions, telles que les cellules souches sanguines ^[505]. Ces systèmes, parmi lesquels la recombinaison phiC31 et le système de transposases *Sleeping Beauty* (SB), et piggyBAC ^[506,507], présentent néanmoins des risques similaires aux vecteurs viraux intégratifs.

2. Réponses immunitaires et inflammatoires face aux systèmes de transfert de gènes non viraux

Très tôt, il fut montré que des administrations intraveineuses rapprochées de lipoplexes ne permettaient pas forcément de transférer à nouveau le tissu pulmonaire ^[508]. Un peu plus tard, la même équipe montra que l'administration d'anticorps dirigés contre le TNF- α permettait de rallonger la durée d'expression du transgène chez la souris, et d'augmenter le niveau d'expression obtenue après la seconde administration, le niveau d'inflammation pouvant par ailleurs être réduit en utilisant des plasmides préalablement méthylés ^[509].

De nombreuses études font état de l'activation du système immunitaire inné suite à l'injection intraveineuse de lipoplexes ^[510,511]. Les motifs CpGs portés par le plasmide, et reconnus par le système immunitaire inné, à travers les TLR9 à l'intérieur des endosomes, demeurent les activateurs principaux de cette réponse. Celle-ci se traduit par une forte production de cytokines proinflammatoires (IFN- γ , IL-6, TNF- α ,...) ^[407,497], souvent à l'origine ou accompagnée de toxicités hépatiques et pulmonaires transitoires, ainsi que d'une atténuation de l'expression du transgène ^[509]. Il est par ailleurs intéressant de noter que l'administration séquentielle des liposomes cationiques puis de l'ADN (permettant également la transfection), réduit de façon significative la production de cytokines chez la souris ^[512]. Ces résultats suggèrent que la présentation des motifs CpGs sur les particules lipidiques amplifie la réponse immunitaire.

Dans le but de réduire la réponse inflammatoire liée au plasmide, et grâce à l'accessibilité des technologies du génie génétique, des constructions délétées de la totalité des motifs CpGs ont été conçues et évaluées ^[502]. Par aérosolisation de lipoplexes (contenant du GL67 stabilisé) chez la souris, les auteurs ont montré que si l'inflammation induite diminuait

proportionnellement au nombre de motifs CpGs portés par le plasmide, celle-ci ne pouvait être abrogée qu'en éliminant la totalité d'entre eux^[502]. Il est par conséquent préférable d'utiliser des plasmides totalement CpG-free, surtout lorsque l'on cherche à traiter, de façon répétée, un organe déjà en proie à une inflammation chronique (comme c'est le cas du poumon dans la mucoviscidose).

Comme cela a déjà largement été expliqué précédemment, l'ajout de motifs PEG à la surface des vecteurs synthétiques contribue à stabiliser les complexes ainsi qu'à diminuer les interactions avec les constituants biologiques sanguins et, par conséquent, leur potentiel à être reconnus par le système immunitaire. Cependant, plusieurs études récentes, réalisées sur différents modèles animaux, montrent qu'une première injection intraveineuse de liposomes PEGylés entraîne une diminution du temps de circulation de la seconde dose (injectée quelques jours plus tard), les liposomes s'accumulant alors rapidement au niveau du foie. Cette réaction a été appelée « phénomène de clairance sanguine accélérée » (ou ABC pour *Accelerated Blood Clearance*). Son mécanisme sous-jacent impliquerait la production d'IgM, au niveau de la rate, dirigés contre les motifs PEG suite à une primo-injection^[513,514]. L'intensité du phénomène ABC serait dépendante de plusieurs facteurs tels que (i) les caractéristiques physicochimiques des complexes (les grosses particules étant plus facilement reconnues par les lymphocytes B à l'origine des IgM anti-PEG), (ii) la quantité de matériel génétique et la présence de motifs CpGs^[515], et (iii) le temps de latence entre les administrations successives^[516]. Néanmoins, des produits thérapeutiques PEGylés sont d'ores et déjà sur le marché (tel que la doxorubicine commercialisée sous le nom de DOXIL®) sans qu'aucun problème d'atténuation d'efficacité n'ait pour l'instant été rapporté suite à des prises espacées de quelques semaines.

Concernant des administrations répétées par aérosol chez la souris, les complexes composés de PEI et d'un plasmide CpG-free (possédant des séquences optimales pour une expression soutenue du transgène au niveau pulmonaire) se sont montrés moins efficaces après la seconde administration qu'après la première, même lorsque les administrations étaient espacées de plusieurs mois^[289]. La problématique des administrations répétées sera par ailleurs discutée plus en détails dans la suite du manuscrit.

VI Evolution des lipides cationiques développés au laboratoire

L'équipe « Thérapie génique et cellulaire » de l'unité INSERM U1078, en étroite collaboration avec l'équipe « phosphore et vectorisation » de l'UMR CNRS 6521 à Brest, a travaillé au fil des années sur le développement et l'optimisation de lipides cationiques originaux afin de les rendre de plus en plus performants pour la délivrance de gènes d'intérêt. Lorsque la collaboration a commencé, peu de vecteurs synthétiques phosphorylés avaient jusqu'alors été synthétisés et testés. Pourtant, les connaissances structurales et fonctionnelles des phospholipides membranaires naturels, ainsi que l'utilisation de colipides zwitterioniques phosphorés DOPE et DOPC, laissaient supposer que les phospholipides d'inspiration biologique pourraient être d'excellents candidats pour le transfert de gènes. Ainsi, à partir d'une formule initiale mimant les phospholipides membranaires, plusieurs variations structurales ont été apportées et les efficacités de transfection des composés synthétisés ont ensuite été évaluées *in vitro* et *in vivo* [325,356].

On peut ainsi distinguer plusieurs générations de vecteurs. Tout d'abord celle des phosphonolipides monocationiques, composés d'une tête polaire ammonium reliée par un bras espaceur phosphonate à deux chaînes lipophiles (oléyle (C₁₈H₃₅), tétradécyle (C₁₄H₂₉) ou stéaryle (C₁₈H₃₇)) [517]. Dans un second temps, des variations au niveau de la tête polaire ont été apportées, telles que l'utilisation de polyamines, de différents ammonium quaternalisés ou encore d'une fonction guanidinium. Dans cette famille de composés, le GLB73 (Figure 45) montra une efficacité de transfection significative *in vitro* sur différents types cellulaires d'origine hématopoïétique [518,519], ainsi qu'après administration intraveineuse chez la souris [339,520]. Les études de biodistribution menées en parallèle ont montré que les lipoplexes s'accumulaient notamment au niveau pulmonaire après délivrance systémique [521].



Figure 45 : Structure du GLB 73

La seconde génération de vecteurs fut caractérisée par le remplacement du cation ammonium par un arsonium ou un phosphonium, ainsi que par des variations sur la longueur de la chaîne carbonée du bras espaceur^[522]. Ce choix faisait suite à des études montrant que la substitution du groupement ammonium de deux agents antitumoraux (l'edelfosine et la miltefosine), par des fonctions phosphonium et arsonium, permettait de diminuer la toxicité des produits sans en modifier l'activité thérapeutique^[523]. Cette propriété fut également retrouvée concernant les nouveaux lipides cationiques synthétisés^[522], ces derniers ayant également une plus grande efficacité de transfection^[355,524]. Le choix d'utiliser une tête polaire arsonium peut paraître surprenant, mais contrairement à l'arsenic, les dérivés arsonium tels que les arsenobétaines présentes dans les fruits de mer ne sont pas toxiques^[525].

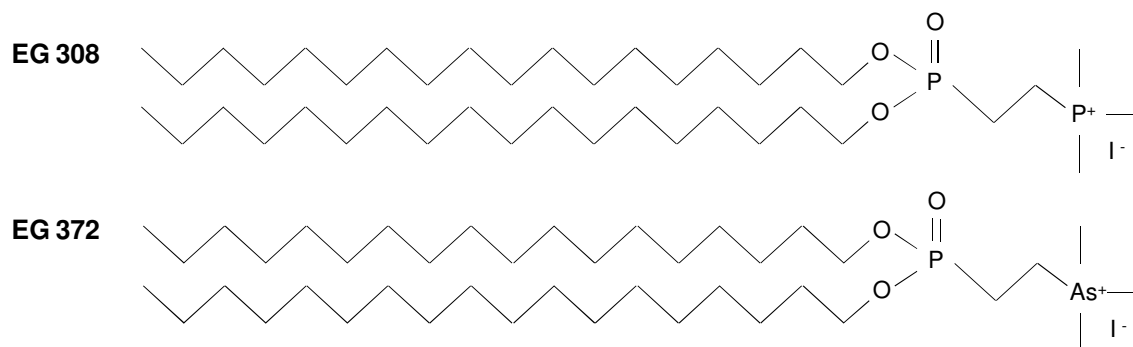


Figure 46 : Exemples de phosphonolipides de 2^{ème} génération

Dans le but d'améliorer les performances des phospholipides, l'introduction d'un nouvel espaceur phosphorylé a été réalisée. L'idée était de remplacer la liaison phosphonate par une liaison phosphoramide, susceptible d'être clivée lors de l'acidification des endosomes et ainsi favoriser la sortie de l'ADN libre à proximité du noyau. En plus des têtes polaires ammonium, phosphonium et arsonium évoquées précédemment, des têtes cationiques hétérocycliques (imidazolium, thiazolium et pyridinium) furent également testées. Bien que ces molécules s'avèrent insensibles à la gamme de pH retrouvée au niveau endosomal (le clivage de la liaison P-N opérant à pH 2), les différents composés de cette famille montrèrent à nouveau une nette amélioration de l'efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo* par rapport aux dérivés phosphonates^[526,527]. Ces composés permirent, entre autres, de transférer de façon efficace le gène *CFTR* dans des polypes nasaux issus de patients mucoviscidosiques^[528]. Le niveau de toxicité induite s'est avéré être lié à la nature de la tête polaire, les composés possédant un

ammonium étant beaucoup plus toxiques que ceux possédant un phosphonium, eux-mêmes plus toxiques que les composés arsonium. Parmi ces nouveaux lipides appelés lipophosphoramidates^a, le KLN47 (Figure 47), possédant deux chaînes oléiques a donné de très bons résultats de transfection pour une toxicité limitée^[529], et s'est depuis imposé comme un vecteur de référence au laboratoire.

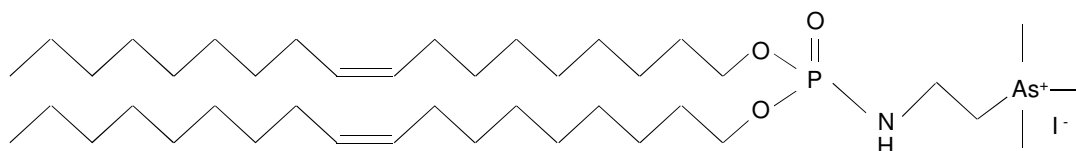


Figure 47 : Structure du lipophosphoramidate KLN47

Avec l'objectif de créer un pouvoir tampon à l'intérieur des endosomes qui favoriserait la libération des acides nucléiques à proximité du noyau, des molécules de type phosphoguanidine ont également été synthétisées (Figure 48). Cependant, ces composés ne présentèrent pas de gain en termes d'efficacité de transfection par rapport au KLN47^[529].

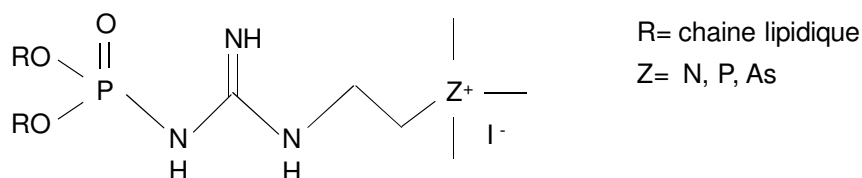


Figure 48 : Exemple de phosphoguanidine

Les travaux se sont ensuite centrés sur la nature de la chaîne grasse des lipophosphoramidates. Des composés portant des chaînes aliphatiques à 18 carbones, possédant de 0 à 3 insaturations, ont ainsi été synthétisés et testés afin de savoir si ces variations pourraient conférer des caractéristiques physicochimiques propices au trafic intracellulaire des complexes (fluidité, fusogénicité, ...). Des études de physicochimie ont notamment été réalisées avec le composé BSV4 (Figure 49), possédant des chaînes linoléiques (double insaturations). Bien qu'étant très toxique *in vitro*, ce composé se montrait

^a Brevet International PCT n°FR03/50116 -07/11/2003

particulièrement efficace pour transfecter le tissu pulmonaire murin après administration intraveineuse (en comparaison avec son homologue KLN47) ^[494]. Les études montrèrent que le BSV4 présentait davantage de fluidité mais était pourtant moins fusogène que le KLN47.

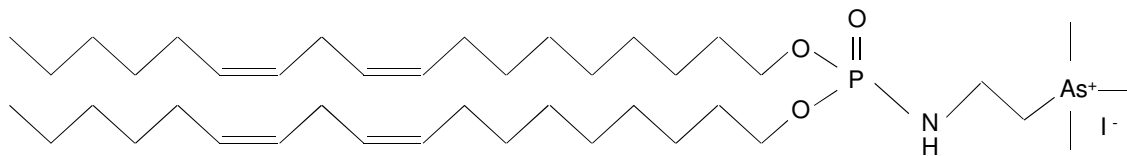


Figure 49 : Structure du lipophosphoramidate BSV4

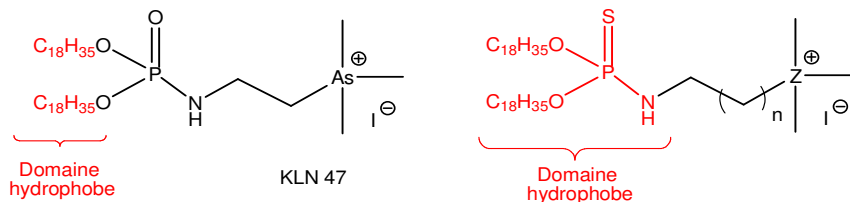
D'autres têtes polaires ont été greffées sur la structure des lipophosphoramidates, telles que des têtes dicationiques associant un ammonium ou un imidazolium avec un ammonium, un phosphonium ou arsonium ^[530]. Cette stratégie avait pour but d'augmenter le nombre de charges positives permanentes par molécule et ainsi diminuer la quantité de matériel lipidique nécessaire pour condenser et délivrer une même quantité d'acides nucléiques. Les résultats donnèrent des efficacités de transfection *in vitro* intéressantes, le composé portant un ammonium central et un phosphonium terminal se montrant plus efficace et moins toxique que tous les autres composés (y compris les composés monocationiques) ^[530]. Ces composés nécessiteraient néanmoins une évaluation *in vivo* pour confirmer les résultats préliminaires.

Des lipophosphoramides neutres (colipides) arborant un motif imidazole ont également été synthétisés, leur association avec divers lipides cationiques (phosphoguanidines et DOTAP) montrant des efficacités de transfection jusqu'à 100 fois supérieures aux mêmes composés formulés avec la DOPE, le colipide le plus couramment utilisé ^[465].

Au cours de sa thèse, Aurore Fraix a synthétisé de nouveaux vecteurs phospholipidiques soufrés dans le but de trouver un compromis entre la capacité à former, une fois associé au plasmide, un édifice suffisamment robuste pour surmonter les contraintes extracellulaires, mais tout de même capable d'être dissocié une fois internalisé dans les cellules ^[531]. D'une part, la liaison P=S est moins polaire que la liaison P=O, ce qui étend davantage le domaine hydrophobe et peut avoir une influence sur la formation des objets (liposomes et lipoplexes) et sur leurs stabilités colloïdales (Figure 50A). D'autre part, le motif thiophosphoramidate a tendance à former des liaisons hydrogènes moins robustes que les phosphoramidates car l'atome de soufre est moins bon accepteur de liaisons hydrogènes que l'atome d'oxygène

(Figure 50B). Cela pourrait permettre de libérer plus facilement les acides nucléiques à l'intérieur de la cellule.

A.



B.

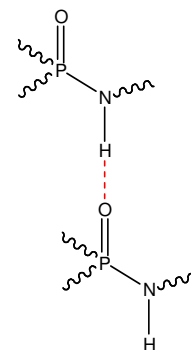


Figure 50 : (A) Comparaison le domaine hydrophobe du lipophosphoramidate KLN47 et celui d'un lipothiophosphoramidate. (B) Liaisons hydrogènes (en rouge) supposées augmenter la stabilité des lipophosphoramidates par rapport aux lipothiophosphoramidates.

Les études par anisotropie de fluorescence (mesure de l'incorporation d'une sonde fluorescente à différentes températures), permettant d'évaluer la fluidité des lipophosphoramidates et des lipothiophosphoramidates formulés sous forme de liposomes, ont montré que les lipophosphoramidates étaient davantage fluides que leurs analogues soufrés en raison de l'implication d'un réseau de liaisons hydrogènes particulièrement dense^[531]. Les tests *in vitro* sur différentes lignées montrèrent que les lipothiophosphoramidates étaient efficaces et relativement peu toxiques, leurs efficacités étant maximales au CR2.

Chapitre III : PARTIE EXPERIMENTALE

Matériels & Méthodes

1. Plasmides

Deux plasmides rapporteurs codant la luciférase de luciole (pTG11033 et pGM144) ont été utilisés lors des expériences de transfection, ainsi qu'un plasmide codant la protéine CFTR humaine (pCIK-CFTR) (Figure 51).

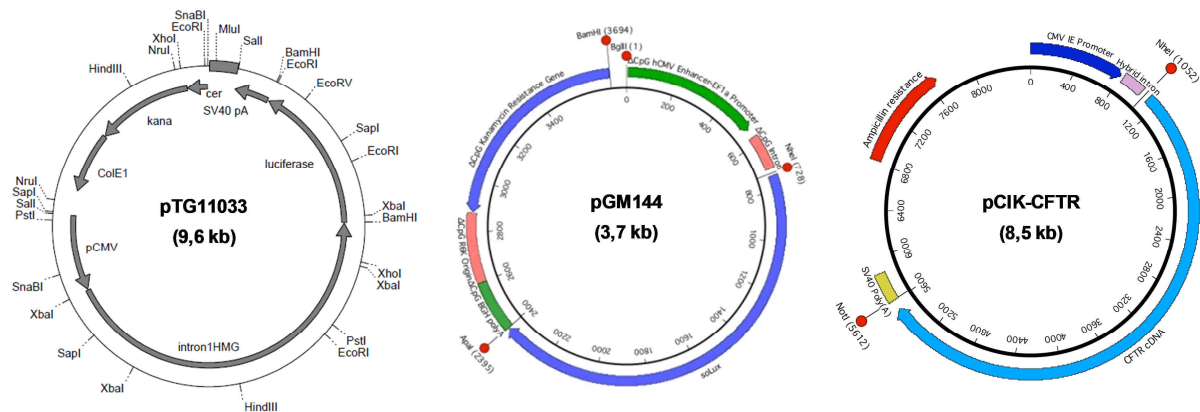


Figure 51 : Cartes génétiques des plasmides pTG11033, pGM144 et pCIK-CFTR

- Le plasmide **pTG11033** (Transgene) est un plasmide de 9683 pb comprenant le gène rapporteur *luc* (codant la luciférase), sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire fort d'origine virale (CMV pour « Cytomégalovirus »). Ce plasmide comprend également l'intron HMG-1 permettant d'augmenter le taux de synthèse de la protéine transgénique en favorisant l'export nucléaire des ARNm. Ce plasmide est amplifié dans la souche DH5α d'*E. coli*, à 37°C.
- Le plasmide **pGM144** (également appelé pG4-hCEFI-soLux) est un plasmide de 3759 pb entièrement CpG-free, qui contient le gène *luc* sous contrôle du promoteur du facteur d'élongation 1α humain (hECF1 α) associé à l'enhancer du CMV humain, ainsi qu'une forme CpG-free de l'origine de répllication R6K. Cette construction a été élaborée dans le but (1) d'être exprimée de façon soutenue au niveau de l'épithélium pulmonaire et (2) d'éviter toute réponse inflammatoire liée à la présence de dinucléotides (un unique motif C-G est suffisant pour induire une inflammation) ^[289,502]. Ce plasmide est amplifié à 34°C dans la

souche GT115 d'*E. coli* qui contient le gène *pir* nécessaire au fonctionnement de l'origine de réplication R6K.

- Le plasmide **pCIK-CFTR** est un plasmide de 8520 pb comprenant le gène *CFTR* (humain) sous contrôle du promoteur CMV. Ce plasmide est amplifié dans la souche DH5 α d'*E. coli*, à 37°C.

Les plasmides pGM144 et pCIK-CFTR ont été gentiment fournis par les Drs. Stephen Hyde et Deborah Gill de l'Université d'Oxford (*Gene medicine group, Nuffield department of clinical laboratory sciences*).

Après amplification, les plasmides sont extraits par lyse alcaline et purifiés avec le kit *Endo Free Plasmid Giga Kit* (Qiagen) suivant les instructions du fournisseur. Le kit permet la lyse des membranes bactériennes suivie d'une purification plasmidique par chromatographie échangeuse d'anions.

Les plasmides sont repris en eau dépourvue d'endotoxine et conservés à -20°C. La concentration en ADN est quantifiée par spectrophotométrie à 260 nm, et la pureté du produit est confirmée par rapport A_{260}/A_{280} compris entre 1,8 et 2. Enfin, l'identité des plasmides est confirmée par différentes digestions enzymatiques suivies d'une migration sur gel d'agarose. La fonctionnalité des cassettes d'expression *luc* des différents lots de plasmides est vérifiée par transfection sur lignée cellulaire au moyen d'un lipide cationique de référence.

2. Lipides cationiques utilisés et formulation

Deux familles de lipides monocationiques développées à travers la collaboration entre l'unité UMR CNRS 6521 et l'unité INSERM U1078 ont été utilisées dans les études expérimentales présentées ci-après. Tout d'abord trois composés de la famille des lipophosphoramidates, possédant une tête polaire de nature arsonium, associée à deux chaînes aliphatiques par une liaison phosphoramidate. Ces composés diffèrent quant à la longueur et au nombre d'insaturations des chaînes aliphatiques. Ainsi, celles de KLN47 sont oléiques (C₁₈H₃₅), celles de BSV4 linoléiques (C₁₈H₃₃), et celles de BSV18 phytanyles (C₂₀H₄₁) (Figure 52).

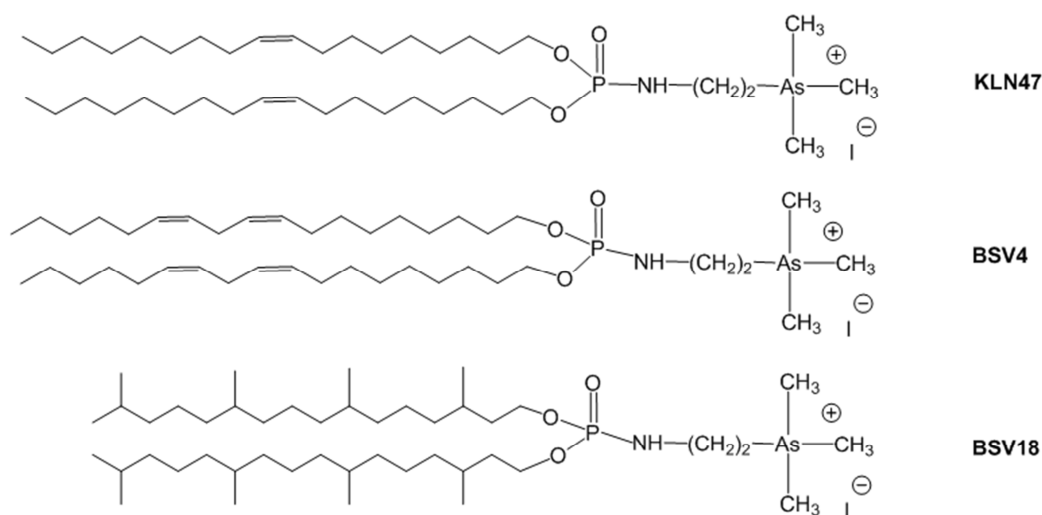


Figure 52 : Structures chimiques des lipophosphoramidates KLN47, BSV4 et BSV18

La seconde famille de lipides cationiques testée intègre, à la place de la liaison P=O du linker phosphoramidate, une liaison soufrée (P=S). Différentes variations structurales ont été apportées aux « lipothiophosphoramidates », aussi bien au niveau du linker que de la tête polaire (Figure 53).

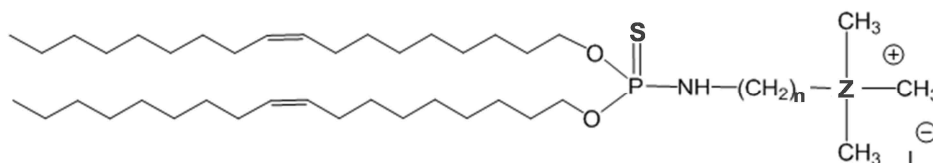


Figure 53 : Structure chimique des lipothiophosphoramidates (n=2 ou 3 ; Z=N, P ou As)

Le lipide commercial Lipofectamine 2000 (Invitrogen) (DOSPA:DOPE 3/1 (m/m) ; Figure 28) est utilisé comme formulation lipidique de référence.

Lors d'administrations par les voies hautes, nécessitant l'utilisation de complexes stables et concentrés dans un volume réduit, le stabilisateur stérique MPEG2000-DSPE (1,2-Distearoyl-phosphatidylethanolamine-méthyl-PEG-2000 ; Lipoid ; Figure 54) a également été utilisé en association avec certains lipides cationiques.

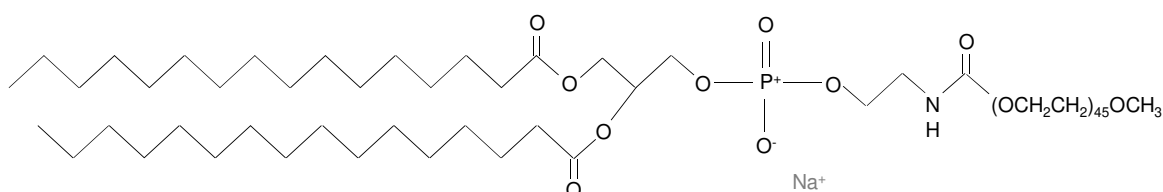


Figure 54 : Structure chimique du stabilisateur stérique MPEG2000-DSPE

Après synthèse, les lipides sont déshydratés et conservés sous forme de poudre à 4°C. Il existe deux types de formulation : en eau et par injection éthanolique. La seconde concerne tout particulièrement les lipothiophosphoramidates qui, en raison de la liaison P=S, sont plus difficilement solubles dans l'eau. Les lipophosphoramidates peuvent quant à eux créer des liaisons entre l'oxygène de la liaison phosphoramide et ceux de l'eau, leur permettant une meilleure hydratation et solvatation.

Dans le cas de la formulation en eau, la quantité de lipides est pesée puis doucement remise en solution dans du chloroforme. La solution est alors homogénéisée puis le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotativ VV 94200, Bioblock Scientific). Le film lipidique ainsi obtenu est repris dans un volume d'eau stérile permettant d'obtenir la concentration souhaitée (1,5 µmol/mL pour les essais *in vitro* et environ 5 µmol/mL pour les essais *in vivo*) pendant un temps variant en fonction du vecteur. Enfin, la solution est vortexée et passée au bain d'ultra-sons (« soniquée » ; Prolabo) par périodes de 10 minutes, jusqu'à obtention d'un mélange de SUVs homogène.

Dans le cas de la formulation par injection éthanolique^[532], les lipides sont réhydratés dans une solution d'éthanol absolu et la solution lipidique obtenue est injectée à l'aide d'une seringue à HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dans de l'eau stérile sous agitation, pour une dilution au 1/35^{ème}. Le mélange est vortexé quelques secondes, puis soniqué par périodes de 10 minutes.

Avant toute évaluation biologique, les composés synthétisés sont au préalable caractérisés par RMN afin de vérifier leur composition, par diffusion dynamique de la lumière (DLS pour *Dynamic Light Scattering*) afin de mesurer la taille des liposomes, et par migration électrophorétique (à l'aide d'un zétasizer) afin de déterminer le potentiel zêta des particules en suspension (liposomes et lipoplexes).

3. Préparation des lipoplexes et détermination du rapport de charges

Avant leur utilisation, les liposomes sont remis à température ambiante (stockage à 4°C) et subissent à nouveau un cycle de vortex/sonication de façon à réhomogénéiser la préparation.

Pour préparer les lipoplexes, l'ADN est ajouté à la solution contenant les SUVs, et le mélange est maintenu à température ambiante pendant 30 minutes à une heure (temps optimal de complexation).

Comme décrit précédemment, le rapport de charges (CR) est défini comme le nombre de charges positives (portées par le lipide cationique) rapporté au nombre de charges négatives portées par les phosphates de l'ADN. Comme une paire de bases présente un poids moléculaire d'environ 666 g/mol, 1 µg d'ADN plasmidique correspond à environ 3 nmol de charges négatives. La formule utilisée pour calculer le volume nécessaire de lipide cationique permettant de complexer une masse donnée d'ADN au rapport de charges souhaité est la suivante :

$$V_{\text{lipide}} = \frac{3 \times m_{\text{ADN}} \times \text{CR}}{C_{\text{lipide}}}$$

masse d'ADN (µg)
Rapport de charges

Volume de lipide (µL)
Concentration en lipide (mmol.L⁻¹)

De façon à étudier l'impact de la formulation sur la transfection *in vitro* (efficacité et toxicité), des rapports de charges allant de 1 à 16 sont préparés et testés avec une masse d'ADN constante (1 µg). En revanche *in vivo*, nous avons fait le choix de délivrer 50 µg d'ADN plasmidique totalement complexés (au CR 4 ou 6) à chaque souris (d'environ 25 g). Ce choix arbitraire peut néanmoins, en fonction de la taille du plasmide utilisé, engendrer des variations dans le nombre de copies délivré.

4. Test de complexation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Avant d'évaluer leur efficacité de transfection, il est indispensable de vérifier la capacité de chaque formulation lipidique à complexer l'ADN plasmidique afin de connaître le rapport de charges pour lequel celui-ci est totalement complexé. Pour cela, 5 µg de plasmide (celui utilisé pour la transfection) sont mélangés avec chaque lipide cationique afin d'obtenir des CRs théoriques allant de 0,5 à 8, puis 10 µL de chaque complexe sont déposés sur gel d'agarose 1 % et mis à migrer quinze minutes à 90 V. Après migration, une bande visible sous UV signifie que l'ADN n'a pas été totalement complexé. Dans le cas inverse, le lipoplexe (chargé positivement) va migrer à l'opposé de l'ADN et ne sera pas visible car le BET n'est pas capable de s'intercaler entre les acides nucléiques lorsqu'ils sont complexés. La migration d'ADN seul est utilisée comme contrôle et permet ainsi d'avoir une information quant au niveau de complexation de l'ADN aux différents CRs.

La technique dite « d'exclusion du BET » permet d'évaluer d'une autre manière la capacité d'un vecteur cationique à complexer l'ADN. Pour cela, 1 µg d'ADN plasmidique préparé avec du BET (bromure d'éthidium) à 0,1 µg/µL sont mélangés au lipide cationique afin d'obtenir des rapports de charges allant de 0,5 à 8, dans des plaques noires de 96 puits. Après 1h de complexation à température ambiante, la fluorescence du BET est mesurée dans chaque puit au fluorimètre ($\lambda_{\text{excitation}}$: 530 nm, $\lambda_{\text{émission}}$: 590 nm ; Fluoroscan, Ascent). Lorsque l'ADN est totalement complexé, le BET est exclu et sa fluorescence diminue. Une émission de fluorescence signifie ainsi qu'il reste de l'ADN libre, c'est-à-dire non complexé par le lipide cationique.

Les tests de complexation ont pu être réalisés sous plusieurs conditions : en eau, en glucose 5 %, en NaCl 0,9 %, ou en présence du stabilisateur stérique MPEG2000-DSPE. Cela permet de connaître les conditions expérimentales adéquates en fonction des voies d'administrations choisies.

5. Transfection *in vitro*

a) Lignées cellulaires et conditions de culture

Les vecteurs ont été évalués *in vitro* sur différentes lignées cellulaires : deux lignées cancéreuses, dérivées respectivement de cellules épithéliales d'adénocarcinome du col de l'utérus (HeLa) et d'adénocarcinome pulmonaire humain (A549), ainsi que deux lignées d'épithélium bronchique non cancéreuses et polarisées, l'une sauvage (16HBE14o-) et l'autre homozygote pour la mutation $\Delta F508$ (CFBE41o-), toutes deux fournies par le Dr. Gruenert (Université de Californie). Les lignées sont cultivées en flasque de 75 ou de 175 cm², en étuve à 37°C sous atmosphère enrichie à 5 % de CO₂.

Du fait de leur polarité baso-apicale, les cellules 16HBE14o- et CFBE41o- sont cultivées sur des supports dits « coatés », mimant la matrice extracellulaire. Ceci leur permet d'adhérer sur le support et de conserver à la fois leur phénotype différencié et leur polarité. Le produit de coatage est composé de 100 mL de *LHC basal medium* (Biosource Int'l/Biofluids 118-500), 10 mL de BSA (1 mg/mL ; Biosource Int'l/Biofluids), 1 mL de collagène de boeuf (2,9 mg/mL ; BD Laboratories), 1 mL de fibronectine humaine (1 mg/mL ; BD Laboratories).

Les cellules cancéreuses sont cultivées en milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM ; Cambrex/Lonza) et les cellules bronchiques en milieu essentiel minimal (EMEM ; Cambrex/Lonza). Les milieux sont supplémentés avec 10 % de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-Glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 U/mL de streptomycine. Chacune des cultures est maintenue à 37°C et 5 % de CO₂ à une concentration comprise entre 10⁵ et 10⁶ cellules par mL, contrôlée par comptage après coloration au bleu trypan.

b) Protocole de transfection *in vitro*

L'activité de transfection *in vitro* des complexes lipides/ADN est testée sur les lignées HeLa, A549, 16HBE14o- et CFBE41o- à l'aide du plasmide rapporteur pTG11033. Les cellules sontensemencées en plaques de 24 puits à raison de 100 000 cellules par puit 24 h avant leur transfection (chaque condition est tripliquée), et incubées pendant une nuit à l'étuve (37°C, 5 % de CO₂, en atmosphère humide). La transfection des cellules est réalisée telle qu'elle fut décrite par Felgner^[38], à l'exception des modifications suivantes. Le plasmide est mélangé

testée. La révélation comporte trois étapes successives : la lyse des cellules, le dosage des protéines totales, et le dosage de l'activité luciférase dans chaque condition.

(1) Lyse cellulaire

Le milieu de culture est tout d'abord retiré par retournement des plaques (24 puits), puis les cellules sont rincées avec du PBS 1X et enfin lysées avec 200 μ L de tampon de lyse 1X (PLB pour *Passive Lysis Buffer*, Promega) pendant 30 minutes sous agitation à 4°C. Le lysat est ensuite prélevé pour réaliser le dosage protéique et la mesure de luminescence.

(2) Dosage protéique

La concentration de protéines dans chaque puit est mesurée à 562 nm (spectrophotomètre ELx808™, BioTek Instruments) grâce à la méthode photométrique à l'acide bicinchonique (*BCA protein assay reagent kit*, Interchim) dont le principe repose sur le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin qui transforme les ions cuivre II en ions cuivre I. Ces derniers se complexent alors avec l'acide bicinchonique pour former un complexe de couleur pourpre (réaction du biuret, [Figure 56](#))^[533]. Une gamme étalon d'albumine de sérum bovin est réalisée en parallèle.

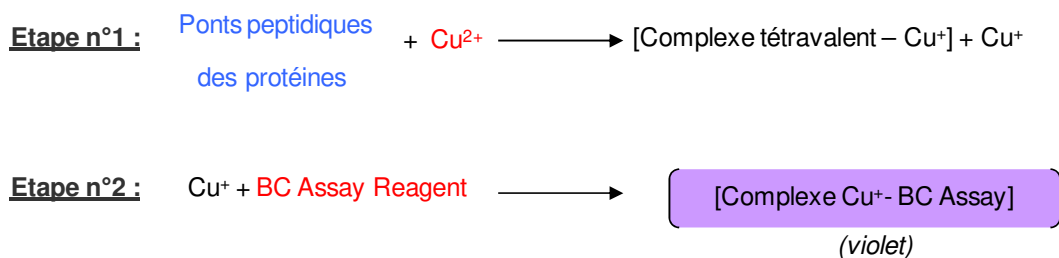


Figure 56 : Réactions chimiques intervenant dans le dosage des protéines par la technique dérivée de celle du Biuret. Les composés apparaissant en rouge proviennent du réactif BC Assay, et ceux en bleu proviennent de l'échantillon à doser.

(3) Dosage de l'activité luciférase

La détection de la luciférase dans les cellules transfectées est réalisée grâce à un test de chimiluminescence en suivant les instructions du fabricant (Promega, Charbonnière, France). Son principe repose sur la capacité de la luciférase à catalyser l'oxydation de la luciférine en

oxyluciférine. Cette réaction s'accompagne d'une émission de photons proportionnelle à la quantité de protéines présentes (Figure 57). Cette émission de photons est quantifiée grâce à un luminomètre à plaque (MLX[®] Microtiter Plate Luminometer, Dynex). L'efficacité de transfection est calculée en faisant le rapport entre l'activité luciférase obtenue (en RLU) et la masse (en mg) de protéines totales correspondante.

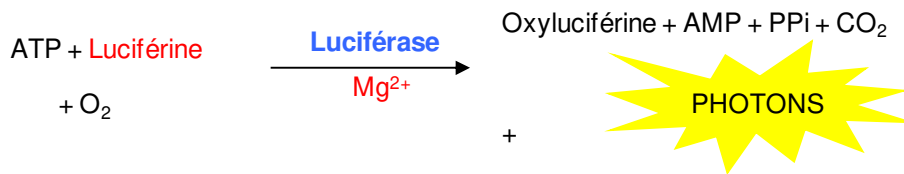


Figure 57 : Schéma de la réaction chimique intervenant dans le dosage de la Luciférase. Les composés apparaissant en rouge proviennent du réactif *Luciferase Assay System*.

6. Protocole de transfection *in vivo*

Les tests *in vivo* ont majoritairement été réalisés sur des souris Swiss femelles, âgées de 6 semaines et provenant de l'animalerie Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Afin d'évaluer la capacité de transfert du gène *CFTR* dans un modèle animal plus adéquat, nous avons également travaillé sur des souris de fond génétique C57BL/6, dont le gène *cftr* a été invalidé par transgénèse (insertion d'une cassette de résistance à la néomycine au niveau de l'exon 10 par recombinaison homologue)^[534]. Cependant, ces souris ne développent pas les lésions pulmonaires caractéristiques de la mucoviscidose, alors que l'atteinte digestive leur est en général fatale au-delà de 40 jours de vie. L'absence d'atteinte respiratoire peut avoir diverses explications : (i) une composition cellulaire de l'épithélium bronchique différente (les cellules de Clara étant plus nombreuses chez la souris que chez l'homme) ; (ii) une différence d'expression de *cftr* chez la souris, et/ou une régulation ionique compensée par d'autres canaux Cl⁻ ; ou encore (iii) les canaux CFTR et ENaC ne sont pas co-localisés dans les mêmes cellules, empêchant tout contrôle de ENaC par CFTR.

Les souris *cftr*^{-/-} proviennent de la plate-forme « Institut de Transgénèse Orléans-Villejuif », et ont été obtenues grâce à l'aide de l'association « Vaincre la Mucoviscidose ».

Afin d'évaluer l'état physiologique des souris traitées, un suivi du poids, de la tonicité ainsi que de l'état du pelage est réalisé quotidiennement.

a) Modes d'administration des lipoplexes

Dans le cadre d'une administration intraveineuse, des quantités adaptées d'ADN plasmidique et de lipides sont mélangées de façon à pouvoir injecter à chaque souris 250 ou 300 μL de lipoplexes au rapport de charges voulu, contenant 50 μg d'ADNp. L'administration systémique des complexes est réalisée *via* la veine caudale après avoir anesthésié les souris par inhalation d'isoflurane (Forène[®], Abbott), ou les avoir simplement maintenues sous un bécher.

Des essais d'administrations par les voies hautes ont également été réalisés. Une importante étape de mise au point a été nécessaire afin de trouver les conditions permettant de délivrer une solution directement à l'intérieur des poumons, sans avoir à pratiquer le moindre geste chirurgical. Notre protocole est maintenant le suivant. Les souris sont tout d'abord anesthésiées à l'aide d'une préparation kétamine/xylazine (6:1) injectée par voie intrapéritonéale (IP), à raison de 2 mg de kétamine pour une souris de 20 g. Comme l'illustre la [Figure 58](#), la souris est ensuite disposée à la verticale et les complexes sont injectés dans la trachée à l'aide d'une canule fixée à une seringue. Le volume injecté est inférieur à 70 μL afin d'éviter un syndrome de noyade. La souris est enfin maintenue la tête vers le haut afin de minimiser les reflux, et surveillée jusqu'à son réveil.

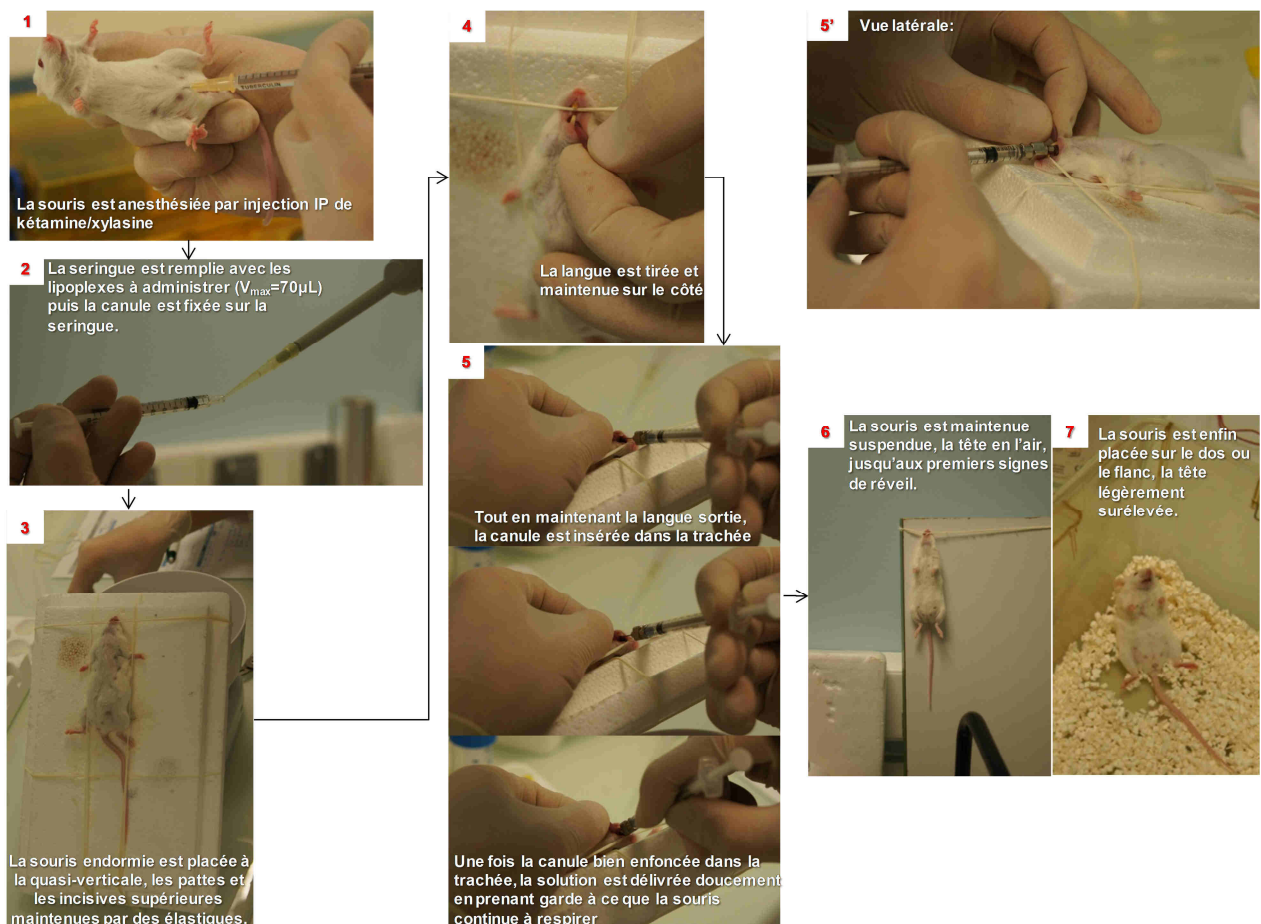


Figure 58 : Les différentes étapes d'une administration intratrachéale

b) Quantification de l'expression du transgène

(1) Imagerie de bioluminescence *in vivo*

Le suivi de l'expression du gène rapporteur *luc* est réalisé par mesure de la bioluminescence émise par les organes transfectés. Pour cela, 200 µL de luciférine (à 20 mg/mL en tampon Hépès 20 mM ; Luciferins, FluoProbes®, Interchim) sont administrés à chaque souris par voie IP, puis ces dernières sont anesthésiées à l'aide d'un mélange air-isoflurane (4 %), avant d'être placées dans la chambre noir de l'appareil d'imagerie (Berthold, Nightowl II). L'émission de photons est mesurée sur les souris endormies pendant une acquisition de 4 minutes, à l'aide d'une caméra CCD préalablement refroidie à -70°C. Le traitement des images est réalisé grâce aux logiciels WinLight et IndiGo du constructeur (Berthold Technologies).

Cette approche par bioluminescence permet ainsi de localiser et de quantifier le niveau d'expression du gène rapporteur *luc* au cours du temps, limitant les variations interindividuelles ainsi que le nombre d'animaux traités. Certaines variations liées à la position de l'animal, ou à l'absorption des photons par les tissus demeurent néanmoins présentes.

(2) Quantification de l'expression du transgène dans les organes isolés

L'efficacité de la transfection non virale du tissu pulmonaire doit être estimée de la manière la plus rigoureuse possible. Comme l'absorption des tissus peut « masquer » le signal *in vivo*, les souris sont sacrifiées à différents temps post-administration, après avoir été imagées. L'activité luciférase est alors mesurée à partir des broyats de différents organes (poumons, foie, rate, cœur,...) ce qui vient compléter l'approche par bioluminescence.

Ces organes, prélevés immédiatement après sacrifice des animaux et congelés à -80°C, sont ensuite broyés à l'aide d'un mortier refroidi à l'azote liquide jusqu'à obtention d'une fine poudre, ou directement à l'aide du dissociateur GentleMACS™ (Miltenyi Biotec). Les cellules des différents tissus sont ensuite lysées avec un volume de PLB 1X (variant entre 700 µL et 1 mL en fonction du volume de l'organe) sous agitation à 4°C pendant 30 minutes. La mesure de l'activité luciférase, ainsi que le dosage protéique, sont réalisés à partir des surnageants obtenus, par les mêmes méthodes que celles pratiquées *in vitro*. Par conséquent, l'efficacité de transfection est également exprimée en RLU/mg de protéines.

A noter que dans certains cas, l'activité luciférase a également été quantifiée sur 25 µL de plasma sanguin provenant des souris traitées (par la technique décrite ci-après).

Concernant les essais de transfection des souris *cftr*^{-/-} avec le plasmide pCIK-CFTR, une quantification des ARNm *CFTR* a été réalisée par l'équipe des Drs. Deborah Gill et Steven Hyde à Oxford, suivant le protocole établie ^[535]. Ce protocole de RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) quantitative en temps réel, utilise la technologie TaqMan (Applied Biosystems), basée sur la détection et la quantification d'une sonde fluorescente dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Cette technique tire partie de l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (*reporter*) (ici le FAM : 6-carboxyfluorocein) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (*quencher*) présent à l'extrémité 3' (ici le TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Lorsqu'il est stimulé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) qui dissipe l'énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence ^[536]. Étant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. A l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre et hydrolyse la sonde hybridée grâce à son activité 5'-exonucléasique. Le *reporter* est alors libéré de l'environnement du suppresseur, permettant l'émission de fluorescence. Celle-ci augmente à chaque cycle, proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (Figure 59). L'augmentation d'émission de fluorescence est, dans notre cas, proportionnelle à la quantité d'ARNm *CFTR*.

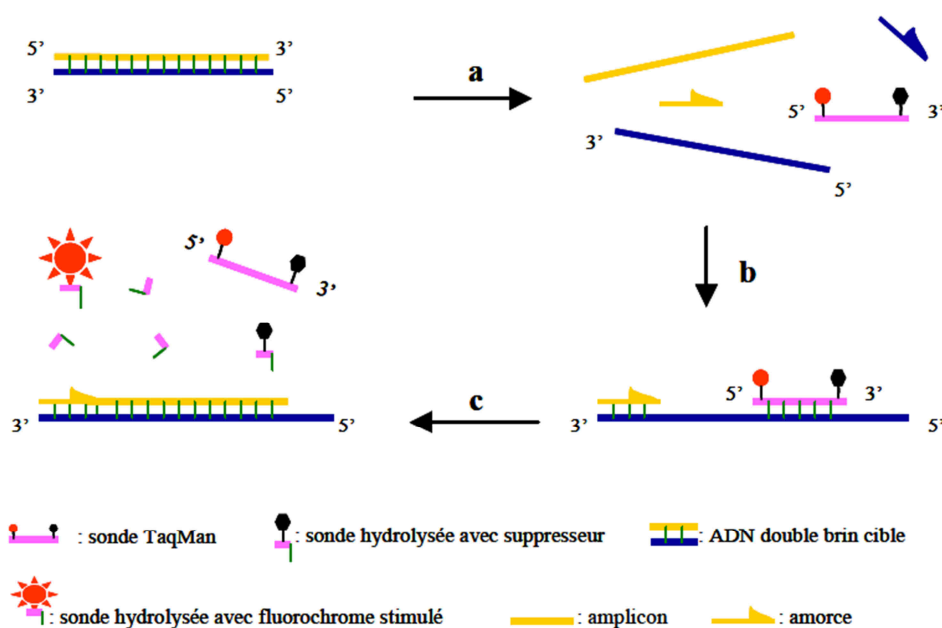


Figure 59 : Principe de l'hydrolyse de sondes dans la technologie TaqMan. (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence^[537].

c) Analyse de l'atteinte hépatique et de la réaction inflammatoire

(1) Prélèvement de sang et isolement du plasma

Afin d'évaluer l'impact physiologique des différents lipoplexes, des échantillons de sang sont prélevés sur chaque souris avant le traitement, puis toutes les 24 h (après le traitement). Pour cela, les souris sont maintenues dans des tubes Falcon percés (50 mL), et une de leurs pattes arrière est rasée. Après avoir mis en évidence la veine saphène par compression abdominale, celle-ci est piquée et 200 à 300 μ L de sang sont récupérés dans une microvette héparinée (Microvette CB 300, Sarsted). A la fin du prélèvement, l'hémorragie est stoppée à l'aide d'une compresse. Les prélèvements sanguins sont ensuite immédiatement centrifugés (2 min, 10000 g à 4°C) et le surnageant, correspondant au plasma, est récupéré et stocké à -20°C.

(2) Dosage des transaminases hépatiques

Le dosage des transaminases hépatiques ALAT (Alanine Aminotransférases) et ASAT (Aspartate Aminotransférases), réalisé sur les plasmas, permet d'apprécier la toxicité générale pouvant être provoquée par les différentes formulations utilisées. Ces deux enzymes catalysent le

transfert d'un groupe aminé de l'acide aspartique ou de l'alanine sur le groupe α -cétonique de l'acide cétooglutarique pour produire notamment du L-glutamate et de l'acide pyruvique (Figure 60).

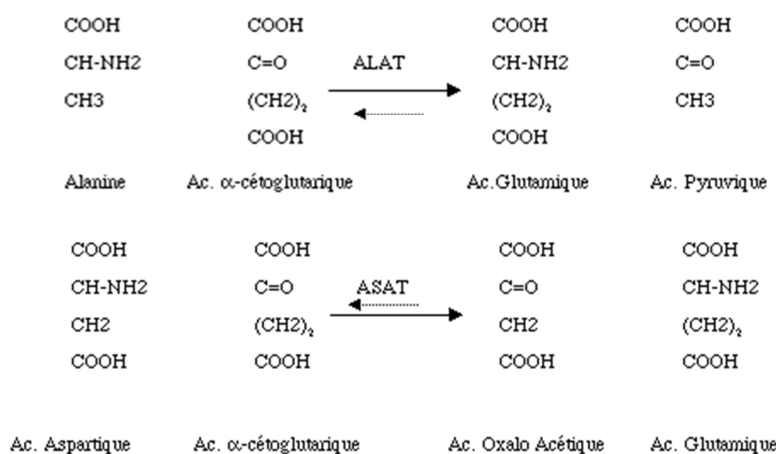


Figure 60 : Réactions catalysées par les transaminases hépatiques ALAT et ASAT

L'activité des transaminases augmente principalement en cas d'hépatite, mais également lors d'une atteinte cardiaque aiguë, ou d'une maladie musculaire. L'activité des enzymes est dosée grâce à des kits commerciaux (ALT/GPT et AST/GOT ; Elitech) à partir de la cinétique d'absorbance à 340 nm, reflétant l'oxydation du NADH en NAD qui intervient lorsque les transaminases sont en présence de leurs substrats respectifs. Les résultats sont exprimés en UI/L (Unités Internationales par Litre de sang).

d) Evaluation de l'impact inflammatoire et immunogène

Afin de d'évaluer le caractère inflammatoire et immunogène de différentes formulations, les niveaux de cytokines et chemokines sériques sont évalués chez les souris traitées grâce au kit *Proteome Profiler* (RnD Systems). Le principe de ce kit se décompose en plusieurs étapes. Tout d'abord, les cytokines présentes dans le plasma vont se fixer à leurs anticorps spécifiques biotinylés. Les complexes formés sont déposés sur une membrane de nitrocellulose sur laquelle sont fixés en duplicats, et dans un ordre précis, les mêmes anticorps non biotinylés. Après fixation des complexes à la membrane suit la fixation de la streptavidine couplée à la peroxydase de raifort (ou HRP pour *HorseRadish Peroxydase*) à la biotine. Enfin, les réactifs de chimiluminescence sont ajoutés, permettant une émission de lumière proportionnelle aux niveaux d'expression des cytokines d'intérêts. Ces concentrations sont évaluées par

densitométrie (BIO-1D, Vilber Lourmat) et comparées à celles de souris témoins. Les résultats sont exprimés en « Intensité moyenne du signal » (*Mean Signal Intensity*) et représentent, pour chaque cytokine, la moyenne d'intensité des deux spots rapportée au niveau des contrôles positifs de chaque membrane.

e) Analyses histologiques

Toutes les études histologiques ont été réalisées par le personnel de la plateforme d'histopathologie H²P² à Rennes, dirigée par le Dr. Alain Fautrel.

(1) Analyse anatomo-pathologique des foies de souris traitées

Des foies et poumons de souris traitées ont été fixés dans le formaldéhyde à 4 %, immédiatement après leur sacrifice. Après plusieurs étapes de déshydratation par des bains successifs de durées variables de formaldéhyde, alcool 100 % et toluène, les tissus sont imprégnés en paraffine. Après avoir réalisé des coupes (3 µm) de chaque tissu au microtome, ces dernières sont déparaffinées et les tissus réhydratés. Pour une étude microscopique de l'état des tissus, les noyaux des cellulaires sont colorés à l'hématoxyline de Gill, le cytoplasme à l'éosine, et le tissu conjonctif au safran.

(2) Identification des cellules transfectées

L'identité des cellules exprimant la luciférase est révélée de deux manières différentes. Dans les deux cas, les premières étapes sont le démasquage des sites antigéniques au citrate et le blocage des sites non spécifiques avec du sérum de cheval. Après fixation des anticorps primaires anti-luciférase, ces derniers sont révélés soit à l'aide d'anticorps secondaires biotinylés couplés à la peroxydase, qui forme un précipité brun en oxydant un substrat chromogène (DAB pour DiAminoBenzidine), soit par des anticorps secondaires couplés à la TRITC (*Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate*), permettant de visualiser le complexe en rouge sous lumière verte (555 nm).

L'identification des cellules exprimant *CFTR* a également été réalisée par marquage indirect, à l'aide de l'anticorps monoclonal de souris MAB25031 (R&D Systems), dirigé contre la partie C-terminale de la protéine CFTR humaine.

I. Les propriétés de transfection d'un lipophosphoramidate portant deux chaînes phytanyles

Dans cette étude, un nouveau composé de type lipophosphoramidate portant deux chaînes phytanyles (appelé « BSV18 ») a été synthétisé et ses propriétés de transfection ont été évaluées *in vitro* et *in vivo*. A travers cette approche, notre but était de mieux comprendre le rôle du domaine lipidique sur le type de structure supramoléculaire formée.

Les études de RMN du ^{31}P sur les préparations liposomales de BSV18 montrent que les chaînes phytanyles permettent, à l'inverse des chaînes oléiques (C18 :1 ; KLN47) et linoléiques (C18 :2 ; BSV4), de favoriser la formation de structures de phases hexagonales inverses ($\text{H}_{\text{II}}^{\text{C}}$), une organisation supramoléculaire qui a prouvé être bénéfique pour la transfection, notamment en déstabilisant la membrane endosomale. Ainsi, dans l'optique d'une thérapie génique de la mucoviscidose et donc du transfert de gènes à destination du poumon, nous avons pu observer que ce nouveau composé était particulièrement efficace et peu toxique *in vitro*, sur plusieurs lignées de cellules épithéliales pulmonaires, dont les cellules CFBE41o-. De plus, après administration intraveineuse de lipoplexes (contenant le plasmide rapporteur pTG11033) à des souris Swiss, ce nouveau composé s'est également montré remarquablement performant pour transfecter le tissu pulmonaire, et plus particulièrement les pneumocytes de type I et de type II. L'expression du transgène, liée à l'activité de son promoteur (CMV), est alors quantifiable par bioluminescence pendant environ 4 jours. Dans l'optique d'une application clinique chez l'homme, nous avons suivi les éventuelles atteintes hépatiques causées par l'administration systémique des lipoplexes chez les animaux traités, ainsi que les réponses immunes et inflammatoires liées à l'administration systémique des lipoplexes, ou de ses différentes composantes séparément (liposomes et ADN). Toutes les réactions que nous avons observées – augmentation du niveau des transaminases après administration de lipoplexes et non après administration de lipides ou d'ADN séparément, réaction inflammatoire mais pas immunogène – ne sont que transitoires.

Les résultats présentés dans l'article ci-après indiquent que les lipophosphoramidates équipées de chaînes phytanyles peuvent être d'un grand intérêt pour le transfert de gènes à destination du poumon, probablement en raison de leur capacité à former des phases hexagonales inverses.

“The gene transfection properties of a lipophosphoramidate derivative with two phytanyl chains”

(Lindberg MF *et al.*, *Biomaterials* 2012 Sep; **33** (26) 6240-6253)

II. L'utilisation du plasmide pGM144 combiné au lipophosphoramidate BSV4 permet une expression du transgène durable et des réadministrations efficaces, sans induire d'effets secondaires chroniques

Dans le domaine du transfert de gènes non viral, l'expression du transgène implique une délivrance efficace de la construction nucléique d'intérêt dans les cellules cibles, et ainsi l'utilisation de vecteurs efficaces. Cependant, comme nous l'avons vu dans le Chapitre I, la construction plasmidique a également un rôle de tout premier plan en ce qui concerne la durée d'expression et les réponses inflammatoires qu'elle peut induire.

L'objectif de l'étude a été de comparer les profils de transfection obtenus avec deux plasmides rapporteurs luciférase (pTG11033 et pGM144), complexés avec le lipophosphoramidate BSV4, après administration intraveineuse chez la souris Swiss. Les différences entre les deux plasmides sont nombreuses, les principales se situant au niveau du nombre de motifs CpGs (le pGM144 n'en contient aucun, à l'inverse du pTG11033) et du promoteur (CMV pour le pTG11033 ; EF1 α pour le pGM144).

Dans les deux cas, une expression du transgène exclusivement pulmonaire est observée par imagerie de bioluminescence suite à l'injection des lipoplexes, mais elle ne dure que 4 jours avec le pTG11033 contre plus de 20 jours avec le pGM144. Avec ce dernier plasmide, d'autres organes que les poumons se sont révélés positifs en bioluminescence, positivité confirmée par mesure d'activité enzymatique sur les tissus prélevés (cœur, rate, reins, foie, graisse abdominale,...). Une fois les signaux de bioluminescence disparus, la réadministration de complexes utilisant le pGM144 permet d'obtenir à nouveau une expression pulmonaire, comparable à la première. En revanche, quelque soit le plasmide utilisé, une période réfractaire semble survenir, puisque les administrations rapprochées de lipoplexes (à quelques jours d'intervalles) ne permettent ni d'augmenter le niveau d'expression, ni de le maintenir. Sur le plan de la toxicité, nous avons pu noter une augmentation de l'activité des transaminases hépatiques ainsi que de certains marqueurs de l'inflammation, au cours des deux premiers jours post-administration. Ces réponses sont transitoires et ne semblent pas varier en fonction du plasmide utilisé, ou encore du nombre d'administrations. La réponse inflammatoire semble par ailleurs plus faible lorsque les administrations ne conduisent à aucune transfection supplémentaire (administrations rapprochées).

Dans l'optique d'administrations multiples du produit de thérapie génique, ces résultats mettent en avant la nécessité d'utiliser de constructions plasmidiques permettant une expression durable du transgène.

“Intravenous transfection of pGM144 using BSV4 lipophosphoramidate allows sustained transgene expression and efficient repeated administrations without chronic side effects”

(Lindberg MF *et al.*, en préparation)

Intravenous transfection of pGM144 using BSV4 lipophosphoramidate allows sustained transgene expression and efficient repeated administrations without chronic side effects

(Lindberg MF *et al.*, in preparation)

ABSTRACT

As any drug, the success of gene therapy is largely dependent on the vehicle that has to selectively and efficiently deliver therapeutic nucleic acids into targeted cells with minimal side-effects. In the case of chronic diseases that require life-long treatment, non-viral gene delivery vehicles are less likely to induce an immune response, thereby allowing for repeated administration. Beyond the gene delivery efficiency of a given vector, the nature of the nucleic acid constructs also has a central importance in gene therapy protocols.

Herein, we undertook to investigate the impact of two firefly luciferase encoding plasmids on the transgene expression profile following systemic delivery of lipoplexes in mice, as well as and their potential to be efficiently readministered. The first plasmid (pTG11033) is driven by a strong ubiquitous cytomegalovirus (CMV) promoter whereas the second one is CpG-free and is under control of the human elongation factor-1 alpha promoter (EF1 α) providing sustained lung expression. The cationic lipophosphoramidate BSV4 has already shown to be very efficient for *in vivo* transfection, but its efficiency had not yet been investigated in a multiple-dose procedure.

As expected, we reported that both lipoplexes mediated detectable bioluminescent signals in the lungs of treated mice following a primary injection. Mice transfected with pGM144 exhibited higher and more sustained transgene expression in lungs than those treated with pTG11033. They also exhibited detectable luciferase activity in other organs as well as in the blood circulation, suggesting its release from the transfected cells.

Repeated administration studies showed that, once the transgene expression had decreased under the bioluminescence background, the second dose of BSV4/pGM144 leads to a similar transfection profile, only if the first one was made several weeks ago. A transient hepatotoxicity and a partial inflammatory response were caused by lipoplex injections, irrespective of the plasmid used. Nevertheless, inflammation was less pronounced after close unsuccessful transfection.

Altogether, these results indicated that repeated systemic administration of lipophosphoramidate-based lipoplexes in mice conducted to an effective lung transfection without chronic side effects, only if an interval of several weeks between subsequent injections was respected.

Keywords: non-viral vector, cationic lipid, CpG, *in vivo* bioluminescence, intravenous transfection, repeated administrations

INTRODUCTION

The use of nanotechnology in the biomedical field has gained of interest in the recent years as a versatile strategy for selective drug delivery. Nanosizing a formulation improves the drug dissolution leading to enhanced drug absorption and bioavailability ^[538]. Depending on their physicochemical characteristics and on their administration route, nanovectors also provide protection and reduced clearance of easily degraded or short half-life molecules such as nucleic acids, thus prolonging pharmacological effects and organ/cell-specific uptake.

However, enhancement of drug delivery using nanoparticles could be accompanied by side-effects. Therefore, the pharmacokinetic pattern of the original drug and the encapsulated one may differ. Consequently, it is of importance to monitor the pharmaceutics and biodistribution of these formulations in order to document the efficacy and possible side-effects, especially when they have to be readministered.

Among nanoparticles, cationic liposomes are widely used as non-viral vectors for both *in vitro* and *in vivo* applications. Most of them are composed of three basic domains: a hydrophilic positively-charged headgroup, a hydrophilic domain and a spacer, linking both parts. Inspired from cell membrane phospholipids, our group has focused during the past decade on modulating each structural domain to improve their gene delivery efficacy, and particularly in lungs ^[2]. Thus lipophosphoramidates, composed of an arsonium headgroup linked *via* a phosphoramidate linker to two aliphatic chains (particularly phytanyl, oleic and linoleic chains) appeared as a promising compromise between high transfection efficiency and moderate toxicity in mice ^[3,4].

Nevertheless, liposome-mediated *in vivo* gene delivery has also been limited by transient transgene expression. Gene therapy of chronic lung diseases such as cystic fibrosis (CF) would require long-term expression of *CFTR* transgene involving repeated administrations of the gene therapy products, in order to obtain sustained gene expression in slowly dividing or terminally differentiated cells of the lungs ^[5]. Since most of viral vectors are ineffective for repeated administrations because of the development of an immune response against viral proteins ^[6], synthetic gene transfer agents (GTAs) appear more suitable for this purpose. However, the suitability of lipophosphoramidate formulations and more broadly, of non-PEGylated formulations for repeated administrations, notably through the intravenous (IV) route, has not yet been extensively investigated. Beyond the necessity to use a safe and very

efficient GTA that overcomes the pathophysiological barriers, two elements of the plasmid DNA (pDNA) have also recently shown their key roles in the level and persistence of gene expression ^[7].

First, replacing the commonly used cytomegalovirus (CMV) immediate/early promoter by a non-silenced promoter such as the human elongation 1 alpha (hEF1 α) promoter has shown hopeful results in maintaining the transgene expression in the lungs ^[8]. Second, the removal all unmethylated CG dinucleotides (CpGs) in the exogenous pDNA sequence, which are detected by toll-like receptor 9 (TLR-9) in the endosomes and trigger innate immunity, appeared as a requirement for future non-viral gene therapy protocols ^[9]. Thus, through an extensive nucleotide optimisation, the UK CF Gene Therapy Consortium has generated a *CFTR* expression plasmid, completely depleted of all CpG sequences, which is currently evaluated in a clinical trial in humans using the GL67 formulation. The *luc* version of this plasmid (pGM144), utilizing the hCEFI promoter (hybrid of CpG-free versions of the human CMV *enhancer* (hC) and hEF1 α promoter sequences), has shown to direct persistent, high-level transgene expression for at least 6 months in the mouse lung after aerosol delivery of lipidic and polymeric GTAs, without any side-effects ^[10,11].

Nevertheless, such a plasmid construct had never been evaluated in an intravenous and repeated administration procedure. We thus combined BSV4 lipophosphoramidate with pGM144 plasmid or with the common CMV-driven luciferase encoding pDNA, and compared their IV transfection profiles in mice. As future treatment of chronic lung diseases will require efficient repeated administrations of GTAs, in order to maintain therapeutic levels of transgene expression, we have explored the kinetics of *luc* expression using both plasmids after several injections, and monitored the hepatotoxicity and inflammation induced.

MATERIALS & METHODS

1. Physicochemical characterization of BSV4-based liposomes and lipoplexes

1.1. BSV4 cationic lipid and zetasizer measurements.

The cationic lipophosphoramidate 4 (BSV4) has been synthesized as previously described [3]. Basically, this compound is characterized by a lipid moiety, consisting of two linoleic chains (C18:2 Δ^9 Δ^{12}), and by a trimethylarsonium cationic headgroup linked to the lipophosphoramidate moiety by an ethylene spacer. The diunsaturated lipophosphoramidate BSV4 is slightly more fluid but less fusogenic than its monounsaturated analogue (KLN47) [3], and exhibits a lamellar organization [4].

To prepare BSV4/DNA complexes, plasmids were first diluted in 0.9 % NaCl and 20 mM HEPES for Zetasizer measurements and *in vivo* transfection assays before being added to the liposomal solution. These mixtures were kept at room temperature for at least 30 min before use, in order to allow the formation of DNA complexes. Lipoplexes characterized by a single theoretical charge ratio (CR) of 4 were prepared, permitting total condensation of pDNA (data not shown). The CR is defined as the ratio of the vector positive charge, carried by the arsonium headgroup, to the negative DNA phosphate charges.

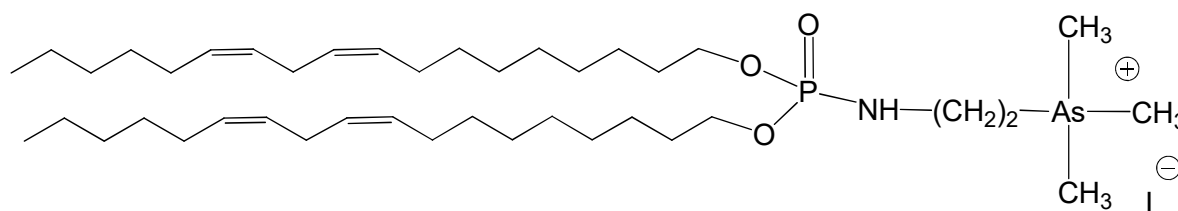


Figure 1: Chemical structure of lipid 4 (BSV4), a cationic lipophosphoramidate with diunsaturated linoleic chains.

The mean particle diameter and zeta potential (ξ) of the liposomes and lipoplexes were measured using a 3000 Zetasizer (Malvern Instruments) at 25°C after an appropriate dilution of the formulations. Briefly, for measurements with lipoplexes, each assay used 50 μ g of plasmid DNA mixed in 0.9 % NaCl and 20 mM HEPES with the required quantity of BSV4 liposomes in order to form lipoplexes with CR 4. For liposome measurements, we used a lipid quantity equivalent to a CR 4 mixture in 20 mM HEPES, 0.9 % NaCl.

2. Luciferase-encoding plasmids

For *in vivo* transfection studies, two different firefly luciferase encoding plasmids were used: pTG11033 (9.6 kb) and pGM144 (3.7 kb; also called “pG4 hCEFI so Lux” [10]) kindly provided from Transgene (France) and the UK Cystic Fibrosis Gene Therapy Consortium respectively. Plasmid pTG11033 carries the luciferase gene expression cassette starting with the cytomegalovirus immediate early 1 (CMV-IE) enhancer/promoter region followed by the intron 1 of the HMGC α R gene for enhanced transgene protein synthesis *via* increased mRNA export from the nucleus, the firefly luciferase gene and the simian virus 40 (SV40) poly(A) signal. Plasmid pGM144 (also called pG4-hCEFI-soLux) [10,11] is entirely CpG-free and bears a codon-optimized form of luciferase cDNA, the human elongation factor 1 alpha (hCEF1 α) promoter coupled with the human CMV enhancer, and a CpG-free form of the R6K origin of

replication that supports pDNA replication in *E. coli* hosts containing the R6K *pir* gene product. The CpG-free construct has been designed to avoid lung inflammation after intra-pulmonary delivery of lipoplexes, but it also appeared to mediate a sustained transgene expression in the lung^[10,11]. Plasmids pTG11033 and pGM144 were amplified in *Escherichia coli* DH5 α and GT115 strains respectively, and purified using the Qiagen Giga Prep Plasmid Purification protocol (Qiagen, Germany). The GT115 strain contains a mutant *pir* gene encoding the π protein, which allows for positive selection of plasmids containing the R6K gamma origin of replication. Plasmid purities were checked by electrophoresis on 1.0% agarose gel. DNA concentrations were estimated spectroscopically by measuring the absorption at 260 nm and confirmed by gel electrophoresis. Only plasmids with an A_{260}/A_{280} ratio between 1.8 and 2 were used.

3. *In vivo* transfection assays

3. 1. *Animals and administrations*

Six to nine weeks old female Swiss mice (Janvier breeding center, Le Genest Saint Isle, France) were housed and maintained at the University animal facility; they were processed in accordance with the Laboratory Animal Care Guidelines (NIH publication #85–23 revised 1985) and with the agreement of the regional veterinary services (authorization FR; 29–024). BSV4-based lipoplexes were prepared at room temperature, in 0.9% NaCl and 20 mM HEPES. The mice were held under a beaker, and 300 μ L of complexes incorporating 50 μ g of pDNA were injected into the tail vein to each mouse within 5 to 10 sec., using a ½ inch 26-gauge needle and a 1 mL syringe. A total of 8 mice received BSV4/pGM144 lipoplexes, and 8 mice BSV4/pTG11033 lipoplexes, both characterized by a CR of 4 (required for completely condensing pDNA^[3]). Additionally, 4 mice received 50 μ g of naked plasmid DNA (pTG11033), and 4 mice received BSV4-based liposomes (quantity equivalent to a CR of 4). Repeated administration experiments were performed using carefully the same protocol conditions.

3. 2. *In Vivo Bioluminescence: Non-Invasive Imaging of Luciferase Activity.*

Mice to be imaged first received an intraperitoneal injection of luciferin (4 mg in 200 μ L hepes Buffer (20 mM); Interchim, France). Three minutes later, the animals were anesthetized with a 4% air-isofluran blend. Once laid in the acquisition chamber, the mice were maintained anesthetized with a 2% air-isofluran mixture at room temperature all along the experiment.

Five minutes after luciferin injection, luminescence images were acquired using an *in vivo* imaging system (NightOWL NC320, Berthold) and associated softwares (WinLight 32 Berthold) with a binning of 8 x 8 and an exposure time of 4 min. Luminescence images were then superimposed onto still images of each mouse. Signal intensities were quantified within the regions of interest as photons/ sec units. Several luminescent acquisitions were taken one after the other without readministration of luciferin, in order to get (1) a ventral view, and (2) lateral views of the luminescent signals, permitting to more easily follow the location and level of transgene expression over time.

3. 3. Luciferase activity in tissue homogenates and plasma samples

Two days after administration, 3 mice from each group were killed by cervical dislocation and their multiple organs and tissues (lung, liver, spleen, heart, leg muscles, abdominal fat, salivary glands, kidney, and brain) were removed for analysis. Luciferase expression was evaluated as previously described^[4]. Briefly, tissue pieces were washed in 1X PBS and disrupted using the gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec, Germany) in 1X Passive Lysis Buffer (PLB; Promega). The supernatant was quantified by a luminometer (MLX® Microtiter Plate Luminometer-Dynex, Guyancourt, France), measuring light emission over a 15-s reaction period. The total protein content of each supernatant was quantified using the BC assay kit (Interchim, France). Results were expressed as total relative light units per mg of total proteins (Total RLU/mg of tot. prot.). In parallel, blood samples (≈100 µL) were collected from the saphenous vein of the remaining treated mice on a heparin tube before and at regular time points after administration of the different formulations. Tubes were then centrifuged at 10,000 g for 2 min at +4°C and 25 µL of blood plasma was harvested to measure luciferase activity. Results were expressed as total relative light units per mL of plasma (RLU/mL).

4. In vivo hepatotoxicity

Using the same blood collection protocol, plasma samples of treated mice were also harvested to measure ALT (alanine aminotransferase) and AST (aspartate aminotransferase) levels. Transaminase activities were quantified using a commercial kit (Elitech, France) according to manufacturer's instructions. This method uses the absorbance kinetic at 340 nm reflecting the oxidation of NADH into NAD operating when transaminases are in contact with their respective substrates. The results were expressed as International Units per Liter (IU/L), and reflected the potential injuries caused by the various formulations, notably of the liver. Adapted for small blood volumes, this method allowed performing the kinetics of transaminase activities on each animal, limiting difficulties due to inter-individual variations.

5. Quantification of the inflammatory and immune responses

The inflammatory and immunogenic responses to transfection with BSV4/pTG11033 and BSV4/pGM144 were evaluated using the Proteome Profiler kit (RnD Systems, USA) according to manufacturer's instructions. The kit permits to quantify the relative levels of 40 cytokines/chemokines (BLC, C5a, G-CSF, GM-CSF, I-309, eotaxin, sICAM-1, IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-12 p70, IL-16, IL-17, IL-3, IL-27, IP-10, I-TAC, KC, M-CSF, JE, MCP-5, MIG, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, RANTES, SDF-1, TARC, TIMP-1, TNF-α and TREM-1) in the plasma of treated mice. Plasma samples were first diluted and mixed with a cocktail of biotinylated detection antibodies. The sample/antibody mixture was then incubated with the Mouse Cytokine Array Panel A to bind any cytokine/detection antibody complex present by its cognate immobilized capture antibody on the nitrocellulose membrane. Following a wash to remove unbound material, Streptavidin-Horseradish Peroxidase and chemiluminescent detection reagents were added sequentially. Light produced at each spot, and proportional to the amount of cytokine bound, was finally quantified by densitometry (BIO-1D, Vilber Lourmat) and compared with results obtained from naive mice (results were expressed as the Mean Signal Intensity of the cytokines, representing the average of the duplicate spots signals in relation to the positive controls intensities of their respective membrane).

RESULTS

1. Physicochemical studies of liposomes and lipoplexes

The liposomal and lipoplex solutions were characterized by dynamic light scattering (DLS – size analyzer) and zeta potential determination.

Table 1 : Zeta potential and size of BSV4-based liposomes and lipoplexes (CR = 4) formulated in 0.9 % NaCl and 20 mM HEPES.

Liposomes	Size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
BSV4	105.5	0.233	+67
Lipoplexes CR = 4	Size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
BSV4/pTG11033	> 800	-	+91.7
BSV4/pGM144	> 800	-	+64.6

First, we observed that BSV4-based liposomes alone (i.e. without pDNA) were characterized by a mean diameter of approximately 105 nm and a positive charge (zeta potential, ξ) of +66 mV (Table 1). These data are consistent with previous measurements^[3].

As indicated in Table 1, BSV4-based lipoplexes were characterized by higher mean diameters (>800 nm) than the liposomes, whereas their zeta potentials were of the same order of magnitude (with pGM144) or higher (with pTG11033). By adding nucleic acids into cationic liposomes, the zeta potential normally decreases due to the negatively charged phosphate groups in pDNA. In our experiments, BSV4-based lipoplexes exhibited higher (pTG11033; 91.7 mV) or slightly lower (pGM144; 64.6 mV) zeta potentials than liposomes. It is likely that the zwitterionic HEPES buffer and the sodium chloride interfere in the measurements, producing rough zeta potential values.

2. *In vivo* transfection experiments.

2.1. Bioluminescence imaging and luciferase activity in organ/tissue homogenates and in plasma samples

As indicated in Materials & Methods, BSV4-based lipoplexes carrying the luciferase-expressing plasmid pGM144 or pTG11033 were administered to Swiss mice *via* tail vein injection. Transgene expression was first detected, localized and quantified by bioluminescence imaging (BLI) *in vivo* (values expressed as photons/sec).

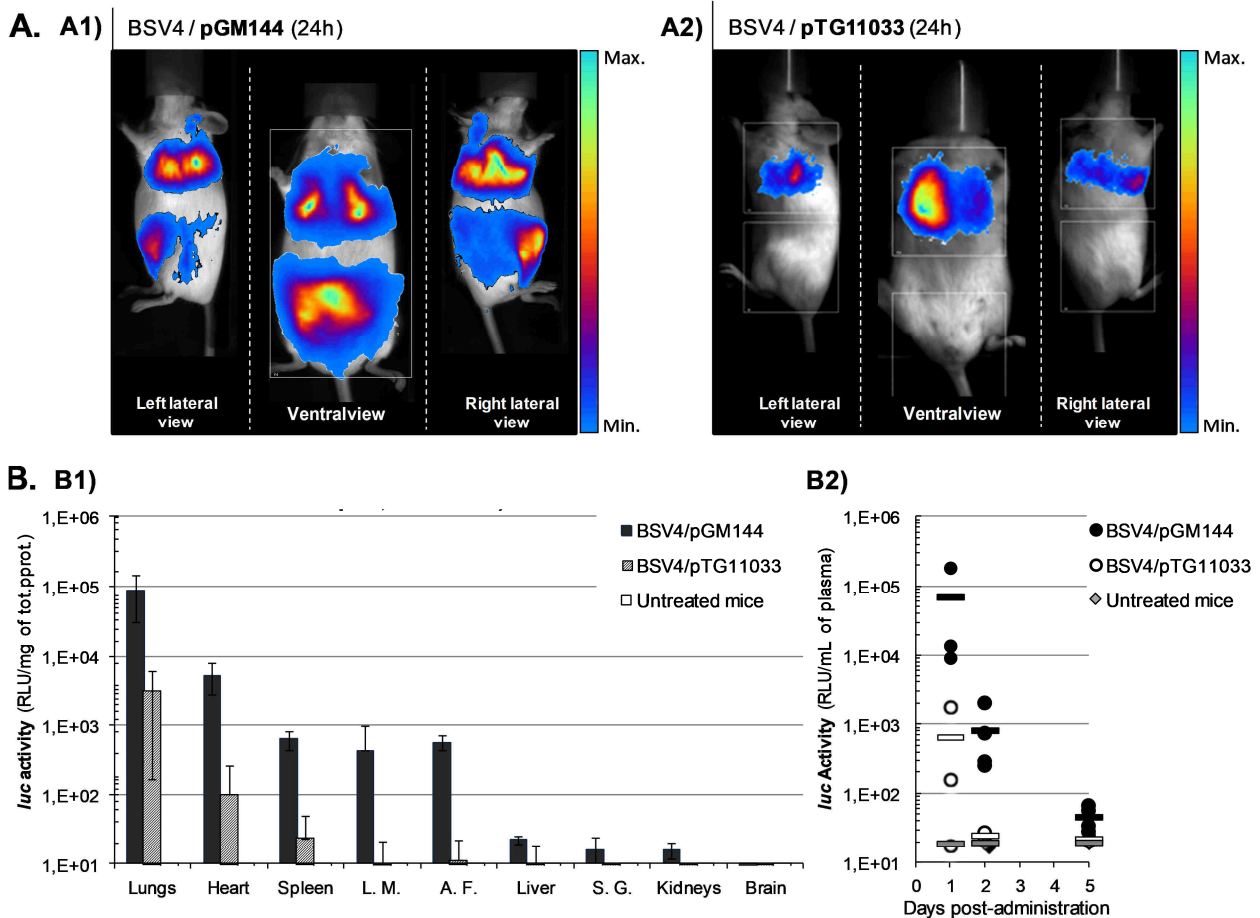


Figure 2: *In vivo* localization of *luc* (A) expression 24 h after intravenous delivery of BSV4/pGM144 (A1) and BSV4/pTG11033 (A2) evaluated by bioluminescence imaging. Luminescence images are superimposed onto still images of each mouse. Luciferase activity measurements (B) on multiple organ and tissue extracts from BSV4/pGM144 (n=3) and BSV4/pTG11033 (n=3) treated mice two days after administration (B1) (“L. M.”: Leg Muscle; “A. F.”: Abdominal Fat; “S. G.”: Salivary Glands), and on plasma of treated mice at three time-points (B2).

As shown in Figure 2A, whatever the plasmid used, significant luciferase activity was observed 24 h following injection of BSV4-based lipoplexes. However, whereas bioluminescent expression issuing from pTG11033 was only detectable into the lung area (Figure 2A2), mice

treated with BSV4/pGM144 also exhibited other bioluminescent signals. Indeed, although the lung appeared to be the most expressing organ, *luc* expression was also observed in several other areas including abdomen and spleen areas (Figure 2A1).

To further assess and localize the *in vivo* luciferase activities of both plasmids, some mice were sacrificed 24 h following lipoplex administration, and luciferase activity was measured in isolated organ and tissue homogenates (data expressed as RLU/mg of total proteins).

The measurements first confirmed the BLI data showing that whatever the plasmid used, the lung exhibited the highest luciferase activity among the various organs (Figure 2B1). Moreover, the *luc* activity in the lungs was higher in mice treated with pGM144 ($8.6 \times 10^4 \pm 5.6 \times 10^4$ RLU/mg of tot. prot.) than with pTG110033 plasmid ($3.1 \times 10^3 \pm 2.9 \times 10^3$ RLU/mg of tot. prot.), a fact being at least partially explained by higher pGM144 copies delivered for a same mass of DNA (50 µg of pDNA contain 1.2×10^{13} copies of pGM144 and 4.7×10^{12} copies of pTG11033).

However, whereas a small luciferase activity was also found in the heart and spleen of both groups of treated mice (higher values in the BSV4/pGM144 group), luciferase was also curiously detected in the leg muscles, the abdominal fat, and residually in the liver, the salivary glands and the kidneys of the BSV4/pGM144 treated mice.

Due to the diffuse BLI signals and to the presence of luciferase in the abdominal fat after BSV4/pGM144 injection, we wondered if luciferase could be present in the bloodstream. Thus, we quantified the luciferase in the plasma of treated mice. As shown in Figure 2B2, significant luciferase activity was found in the plasma of both groups of treated mice 24 h post-injection with higher levels in the BSV4/pGM144 group. Luciferase decreased substantially in the plasma of BSV4/pGM144 treated mice at day 2, a small activity remaining detectable at day 5. No luciferase was detected in the plasma of BSV4/pTG11033 treated mice from day 2 post-administration. These data confirmed that luciferase was circulating in the bloodstream, probably due to its release from the transfected cells, the luciferase activities in the lung and in the plasma being correlated.

2.2. Bioluminescence kinetics and repeatability of BSV4/pDNA systemic delivery

As previously described, transgene expression was detected, localized and quantified by BLI *in vivo* up to the end of bioluminescence detection. The suitability of BSV4-based lipoplexes for repeated intravenous administration was also explored using both types of luciferase encoding plasmids.

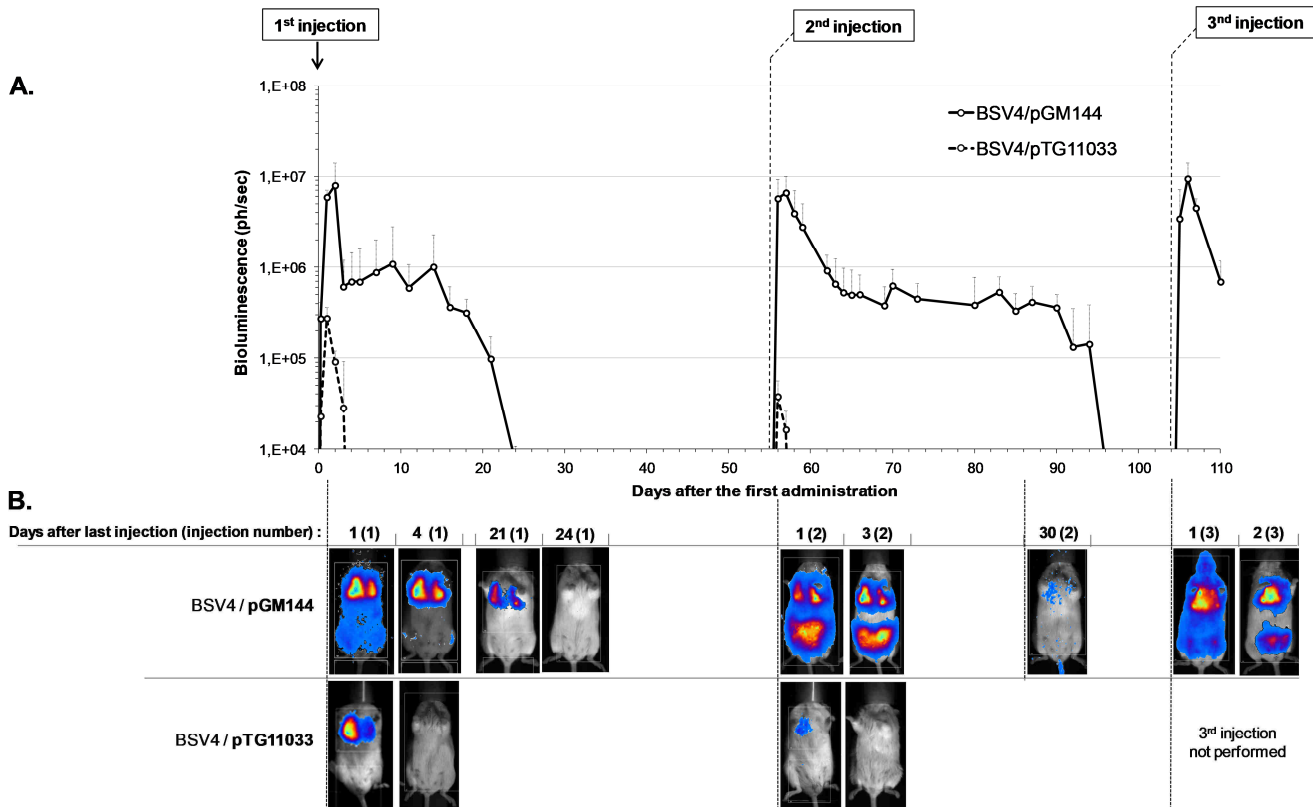


Figure 3: *In vivo* bioluminescence kinetics of *luc* expression after three intravenous deliveries of BSV4/pGM144 (50 µg of pGM144, CR4; n=5) and two deliveries of BSV4/pTG11033 (50 µg of pGM11033, CR4; n=5) quantified by bioluminescence imaging. (A). *In vivo* localization of *luc* expression imaging in a representative mouse of each group at several time points after lipoplex injection by bioluminescence imaging (B).

As expected, the detectable expression of pTG11033 in mice lungs was transient, lasting approximately 3 days, with a peak of *luc* expression at 24 h ($2.7 \times 10^5 \pm 9.0 \times 10^4$ ph/sec) (Figure 3). The pGM144-containing lipoplexes reached a peak of transgene expression at 48 h ($7.9 \times 10^6 \pm 7.7 \times 10^5$ ph/sec), approximately thirty-fold higher than that observed for pTG11033 expression at 24 h. Thus, the levels decreased by one magnitude from day 2 to day 3 and remained steady for up to 10 days. From day 16 to day 24, pGM144 *luc* expression decreased slowly towards the background level, the last signals being always detected in the lung area (Figure 3B).

We then explored the feasibility of *luc* re-expression after a second dose of lipoplexes in mice. Since a *luc* activity often remains in the lungs of treated mice while the BLI signal has just decreased under the background level, we empirically decided to wait for one month after the end of pGM144 expression detection before the subsequent treatment.

It appeared that both lipoplexes were able to mediate a second luciferase expression in the lungs. The second pTG11033 expression was slightly lower ($3.7 \times 10^4 \pm 1.9 \times 10^4$ ph/sec) than the first one ($2.7 \times 10^5 \pm 9.0 \times 10^4$ ph/sec) and only lasted 2 days (Figure 3). On the other hand, pGM144 mediated a second expression similar to the first one, the decrease between the peak and the plateau going however slower (6 days, between days 58 and 64) than after the first injection (1 day, between days 2 and 3) (Figure 3A). The time course of the second transgene expression was also longer as the signal disappeared approximately 30 to 40 days after the second injection. It is nevertheless noteworthy that the chart represents a mean BLI intensity, and most of the treated mice had however a BLI kinetic similar to that obtained after the first injection. Differences between the bioluminescence signals of mice from the same group may be explained by some variability in the *in vivo* experimental conditions (e.g. progressive adiposity leading to photon absorption as well as a variety of other physiological parameters).

We then investigated the feasibility of re-treating the same mice a short time after the BLI signal extinction, while a *luc* activity in lungs was presumed to remain. Thus, a third injection of BSV4/pGM144 lipoplexes was performed ten days after extinction of the second BLI signal, leading to the same lung transfection efficiency as well as the same kinetics of transgene expression (data not entirely shown). The third injection of BSV4/pTG11033 was not performed because two mice were died of old age.

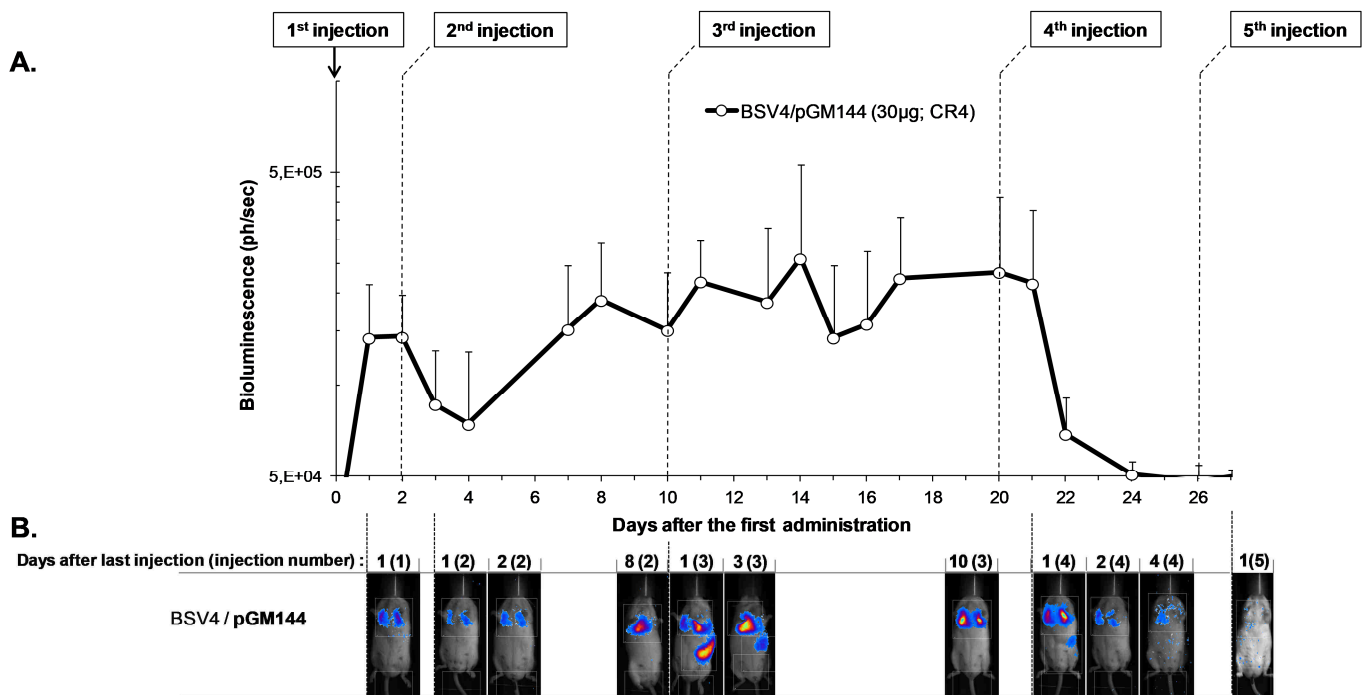


Figure 4: *In vivo* bioluminescence kinetics of *luc* expression after closely repeated intravenous deliveries of BSV4/pGM144 (30µg of pGM144, CR4; n=3) evaluated by bioluminescence imaging (A). Bioluminescence kinetics of *luc* expression in a representative mouse (B).

Then, we assessed the possibility of maintaining the *luc* expression after repeated lipoplex injections at several short time intervals. For that purpose, we diminished the injected lipoplex quantity (30 µg of pDNA, CR4) in order to get a significant *luc* signal without reaching saturation bioluminescence values. In parallel, a second short-term readministration of BSV4/pTG11033 (1 week) did not lead to any bioluminescent signal (data not shown). In the same way, as shown in Figure 4, a second administration of pGM144-containing lipoplexes did not increase the lung signal stemming from the first injection. We injected the third dose at day 10, while *luc* expression in the lungs was steady. Interestingly, the lung transgene expression remained unchanged whereas a *luc* expression signal appeared in the spleen, lasting approximately 3 days (Days 11 to 13; Figure 4B). The fourth injection occurring 10 days after the second one (Day 20; Figure 4A) led to the same observation, i.e. a small and short *luc* expression in the spleen without any variation in the level of transgene expression in lungs (Figure 4B). Indeed, the bioluminescent signal in the lungs decreased under the background level by day 25, similar to the kinetics observed after a single lipoplex delivery. An additional lipoplex administration at day 26 (shortly after the end of detectable *luc* expression) did not restore any transgene expression.

3. *In vivo* hepatotoxicity

As already stated above, with a view to clinical gene therapy, we also investigated the eventual *in vivo* side effects of both types of lipoplexes following repeated administrations. As we had already reported some liver injuries after a single systemic administration procedure, we decided to evaluate the liver reaction induced by either BSV4-based liposomes alone (“BSV4 alone”), BSV4/pGM144 and BSV4/pTG11033 lipoplexes by measuring the levels of liver enzymes AST and ALT in the plasma of the three groups of treated mice over time.

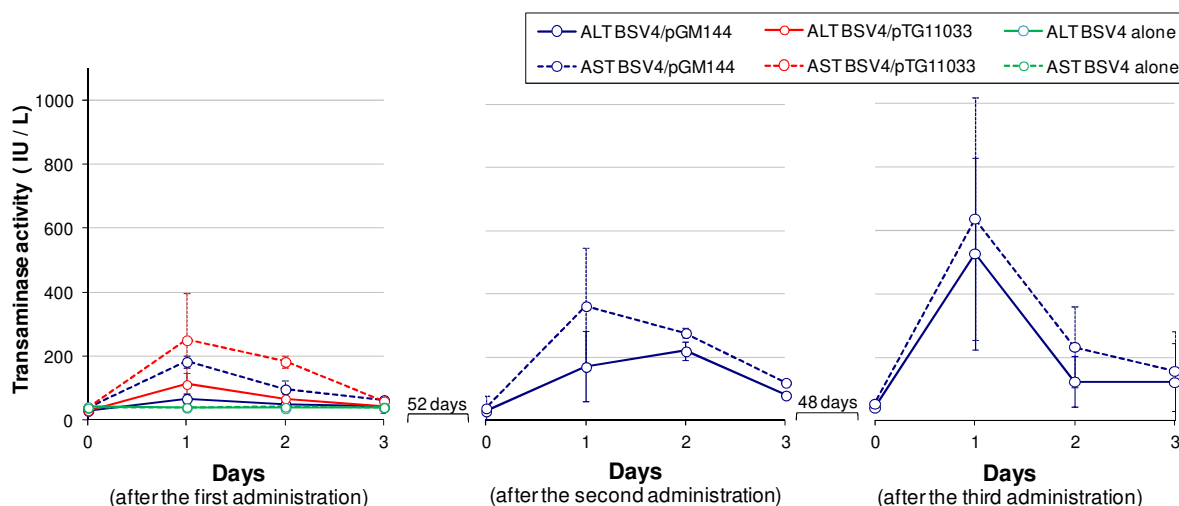


Figure 5: Kinetics of transaminase activities following repeated administrations of BSV4/pGM144 (blue lines, n=3), and one administration of BSV4/pTG11033 (red lines; n=3) and BSV4-based liposomes (green lines; n=3). Time intervals between the measurements are indicated in the figure.

Whereas no variation in transaminase levels was observed when administering the liposomes alone (as previously reported ^[4]), systemic administration of BSV4/pDNA lipoplexes resulted in a fast but transient increase in the transaminase activities, reaching a peak at 24 h post-administration, and recovering baseline values at 72 h (Figure 5). Thus, systemic administration of BSV4 lipoplexes resulted in a short transient liver toxicity in mice. However, there was no statistical difference in the level of toxicity induced by either pTG11033-containing lipoplexes or pGM144-containing lipoplexes, indicating that the plasmids and luciferase protein were not directly implicated into the liver toxicity process.

The second and third administrations of BSV4/pGM144 led each time to an increase in transaminase activities which lasted approximately 3 days. As illustrated by the standard deviation on Figure 5, there were large inter-individual variations in the enzymatic measurements. Consequently, although an increase in the intensity of liver enzyme activities seems to occur after each administration, there is no statistical evidence of such a correlation.

4. *In vivo* inflammation and cytokine profile

To further understand the physiological responses to transfection with both pDNA constructs after several intravenous administrations of lipoplexes, we used the “Mouse Cytokine Antibody Array Panel A” kit (R&D Systems) to quantify numerous inflammatory and immune cytokines in the plasmas of the treated mice.

We first compared the cytokine profiles at day 1 (D1) and day 3 (D3) after a first lipoplex injection containing the CpG-containing plasmid pTG11033 and the CpG-free plasmid pGM144, and at day 1 after the second administration (D1(2)) (Figure 6A). We did not screen the inflammation induced by liposomes and pDNA separately since our previous results showed that naked pTG11033 was not inflammatory, and that lipophosphoramidates injected alone only caused a moderate and very short-term inflammation [4].

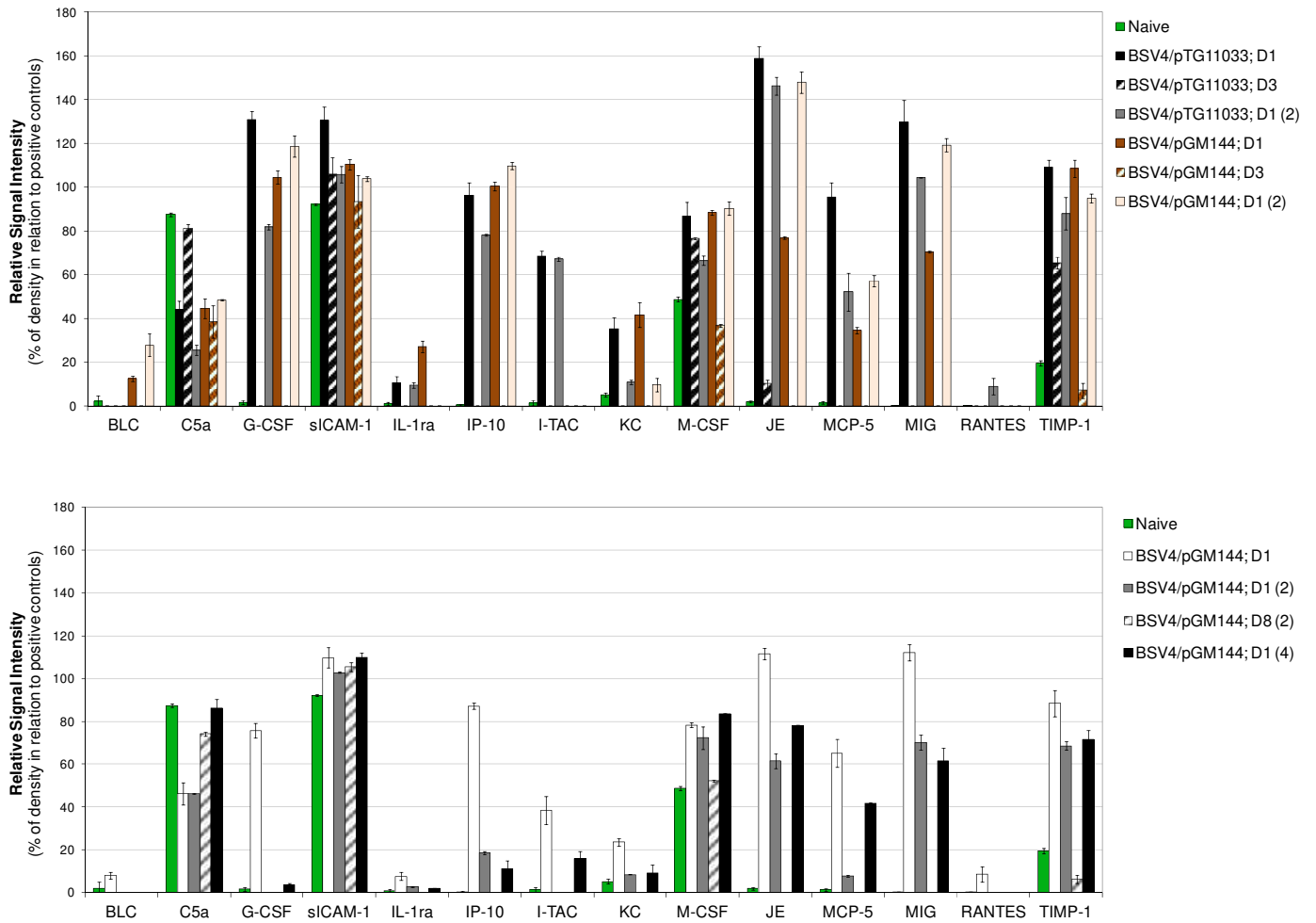


Figure 6: Densitometric analysis of the proteome profiler blots depicting the expression of cytokines and chemokines following BSV4/pTG11033 and BSV4/pGM144 systemic deliveries (A) or multiple close BSV4/pGM144 systemic deliveries (B). Only proteins with significant changes in mean expression levels are depicted in the bar graph.

Whereas no markers of the immunogenic response were expressed in any condition and at any time in the present experiments, intravenous administration of both types of pDNA containing-lipoplexes led to a sharp and quite similar increase in the levels of many pro-inflammatory cytokines such as G-CSF, IP-10, I-TAC, JE, MCP-5, MIG, TIMP-1, and also to a slight increase in KC, M-CSF, and IL1-ra levels (D1; Figure 6A). Whatever the plasmid used, the inflammatory response was highly transient as most of the cytokines went back to their baseline levels at day 3 (D3; Figure 6A).

Of note, C5a, which is a strong chemoattractant involved in the recruitment of inflammatory cells, was however systematically downregulated at day 1. Although C5a went back to normal values at day 3 with pTG11033, it remained at low levels with pGM144 and may thus be related to transgene expression levels.

In contrast, no significant increase in IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α or IFN- γ levels was observed at any time and in any conditions. Nevertheless, it is likely that some cytokines had a brief peak of expression in the next hours following the injection, and our protocol design was not adapted to detect an early inflammatory response. Interestingly, I-TAC expression was only induced by BSV4/pTG11033 administrations. Nevertheless, IP-10 and MIG, which bind the same receptor than I-TAC (CXCR3) were up-regulated with both treatments, indicating that the high level of I-TAC expression might have no major impact on the inflammation process.

We then followed the cytokine profiles in mice treated with lower doses of BSV4/pGM144 (30 μ g of pDNA; CR4) at short intervals, in order to investigate their implication in the absence of cumulative transfection.

We first observed that the cytokine production decreased by delivering lower quantities of lipoplexes (Figure 6B). Second, the level of cytokine response (overexpression or inhibition) was clearly higher after the first administration than after the subsequent ones, the levels going back to their baselines prior to the next injection (D8(3), Figure 6B).

Whereas M-CSF displayed the same level of stimulation after each injection, the level of inflammatory markers was slightly higher after the first administration than after the subsequent ones, the cytokines recovering their baselines values between each injection (D8(3), Figure 6B).

DISCUSSION

The development of non-viral vectors for gene therapy is a fast growing field of research. Among their properties, they have been shown to induce less immune response than viral vectors, which is a crucial point when repeated administration is required as for CF treatment. Since one of our recent work showed that cationic lipophosphoramidates were able to mediate transgene expression in epithelial cells of lung after IV delivery ^[4], we evaluated their potential in combination with an optimized reporter plasmid (pGM144) containing the same backbone and regulatory elements as to the CFTR encoding plasmid used in an ongoing non-viral gene therapy clinical trial of CF. The CMV-driven *luc* plasmid pTG11033 was used as control. We also intended to test whether or not the lipoplexes could be safely and efficiently readministered using systemic procedure.

As shown in previous studies, systemic delivery of the luciferase reporter plasmid pTG11033 complexed to BSV4 lipophosphoramidate mediated high but only short-term lung transgene expression (up to 3-4 days) ^[3,4]. Many factors were discussed as being responsible for the lack of sustained transgene expression, but this phenomenon appeared to be directly related to the attenuation of the CMV promoter activity ^[12-14], and more precisely the silencing of the CMV promoter ^[15-18] due to the partial methylation of the CpG dinucleotides ^[19-21]. Using the codon-optimized CpG-free luciferase encoding plasmid (pGM144) under the same conditions as pTG11033, luciferase was detected by BLI during more than 20 days (Figure 3). The human elongation factor-1 alpha promoter (EF1 α) driving *luc* expression has already been extensively used in several *in vivo* studies as a nonsilenced promoter ^[10,11,17,22,23], but it was the first time that such a CpG-free plasmid was evaluated with a cationic lipophosphoramidate in a systemic delivery procedure.

Previous fluorescent biodistribution studies showed that BSV4-based liposomes and lipoplexes displayed a preferential tropism for the lungs of mice after IV delivery ^[3]. The underlying lung transfection mechanism may involve interactions between cationic lipoplexes and negatively charged serum components leading to lipoplex aggregation ^[24]. Given that the entire cardiac output passes through the pulmonary circulation, which is a rich network of capillary segments as small as a few micrometers, the lipoplex aggregates are likely to accumulate in the lung microcirculation during their first passage ^[25]. Both types of lipoplexes (BSV4/pTG11033 and BSV4/pGM144) exhibited equivalent physicochemical characteristics and may thus have a similar behavior once in the blood circulation. Nevertheless, the lipoplex aggregates also

displayed heterogeneous sizes, including small ones which may escape the lung microcirculation and passively target other organs such as the heart and the spleen where luciferase was also detected (Figure 2B). Their capture by phagocytic cells of the mononuclear phagocyte system (MPS) may also be related to luciferase activity in the spleen, although there is often no direct connection between biodistribution and transgene expression ^[26,27].

If the luciferase activity was systematically higher in organs of mice treated with pGM144 than pTG11033 plasmid, this is at least in part explained by the smaller plasmid size. Indeed, when delivering a same mass of both plasmids, almost three times as many copies of pGM144 were delivered to mice. Probably due to high transfection rates and/or high luciferase production rates by the transfected cells, the luciferase was excreted and remained also detectable in the plasma of the treated mice, the activities being higher and more sustained when using pGM144. Thus, luciferase detection in other organs than the lungs may also come from the protein release and its accumulation in local niches. It would consequently be necessary to establish a clear correlation between the plasmid content and the expression activity in positive tissues. Such a luciferase release raises important issues since an adaptive immune response against the transgene product has already been observed by others ^[23,28]. More precisely, high levels of transgene expression within the first weeks after transfection can result in the clearance of transgene expressing cells ^[23,29]. In our case, since the second and third administrations of BSV4/pGM144 lipoplexes gave rise to similar reporter gene expression profiles than after the first injection, it is likely that such a phenomenon does not occur. It would nonetheless be interesting to perform the same experiments with immunodeficient mice lacking functional B- and T-cells, or using an immune suppression agent. However the second pTG11033 expression in lungs appeared to be slightly lower than the first one, and rapidly silenced. Because both pDNA preparations were purified using the same protocol (Qiagen Giga Prep Plasmid Purification), differences in impurity levels (e.g. residual bacterial genomic DNA) between pDNA productions could be ruled out for silencing phenomenon. It would thus be interesting to check if the CpG contents and/or the CMV promoter are involved in this process.

The long-term expression of the pGM144 plasmid in the lung was in agreement with previous reports obtained after nebulization of lipidic and polymeric formulations ^[10,11]. Nonetheless, the period of transgene expression was longer after nebulization, lasting more than 56 days ^[11]. Many hypotheses can be suggested to explain this difference. The route of

administration can lead to transfection of different cell types. Indeed, the nebulization of non viral gene delivery systems often led to transfection of epithelial cells such as ciliated epithelial cells^[30,31] or alveolar type 1 pneumocytes^[31,32] which are both slowly dividing or terminally differentiated^[5]. Although we have recently shown that the systemic delivery procedure could also transfect type 1 and type 2 pneumocytes^[4], the systemic delivery procedure often leads to transgene expression in various cell populations including endothelial cells^[33,34], macrophages and others that may have higher rates of turnover.

Moreover, although pGM144 is a CpG-free plasmid, CpG islands in residual bacterial genomic DNA contaminating can remain in pDNA preparations and induce inflammation, giving rise to limitation of reporter gene expression^[35,36].

Several groups including ours have already observed a transient hepatic toxicity after systemic delivery of lipoplexes^[4,37-40], the liver being the second most irrigated organ after the lung. We thus measured the liver enzyme levels (ALT, AST) in the plasma of the two treatment groups. We showed that each subsequent lipoplex injection caused transient liver injuries (2-3 days), irrespective of the plasmid used (Figure 5). The correlation between transaminase activities and histopathological changes has been previously confirmed^[4]. These data confirmed that the phenomenon was not caused by the transgene expression or the CpG motifs content.

Many genetic diseases such as CF are likely to require long-term expression of the therapeutic gene, involving repeated administrations of gene therapy formulations. As lungs of mice can be efficiently transfected by a second dose of BSV4-based lipoplexes, we then assessed whether the transgene expression level could be maintained or scaled up by close subsequent reduced doses of pGM144-containing lipoplexes (intervals between 2 and 10 days), while luciferase activity was still detectable.

We observed here that a second lipoplex administration (containing 30 µg of pGM144) two days after the first treatment did not scale up the bioluminescent signal. Repeated injections between 8 to 10 days apart did not show any variation in transgene expression levels, while usual clinical signs of toxicity such as a short piloerection were observed in the next days following injection. Similar to a single administration, luciferase activity finally dropped under background between 3 and 4 weeks. These data demonstrated that a refractory period exists between two successful transfections. To our knowledge, only one study has reached stable transgene expression in mice lungs (without any increase) following repeated IV injections of non-viral GTAs (small amounts of pCMV-luc plasmids complexed to protein/PEI)^[41]. Our

results are consistent with most of the other reports, pointing a refractory period of about 1 to 2 weeks, during which repeated intravenous lipofection was ineffective^[34,42]. The duration of unresponsiveness was closely related to the dose of DNA as it was shortened by decreasing the dose of pDNA^[42], and was mainly attributed to the immunostimulatory effect (e.g. production of TNF- α , IFN- γ or IL-1 β cytokines) of unmethylated CpG sequences^[34,36]. In our experimental conditions, no strong difference between the immunostimulatory activity of the CpG-rich and CpG-free lipoplexes was noticed. As the levels of inflammatory markers correlated with the transfection level (the markers were systematically upregulated after an injection leading to transfection), it is likely the passage of lipoplexes through the endothelium is the major cause of this phenomenon. Nevertheless, the hepatic impairment may also contribute to cytokine production. Consequently, monitoring the induced hepatotoxicity after closely repeated lipoplex injections and quantifying the inflammatory markers directly into the lungs, liver and spleen can help us to understand the origin of inflammation.

Such a refractory period was also observed using another route of administration since the second intranasal delivery of PEI 22 kDa complexes, seven days after the initial treatment, only gave around 20% of the initial gene expression level, and this event was not caused by antibody production against the reporter gene product^[43]. Using PEI 25 kDa, Dames and collaborators showed that repeated aerosol application of PEI 25 kDa complexes, in a 3-day time interval, could maintain gene expression at high levels compared with a single application. Nevertheless, the third dose (which was administered 6 days after the first one) did not totally restore the initial gene expression level^[44]. More recently, Davies and colleagues pointed out the time-dependant refractoriness to a second efficient gene transfer to the lungs using pGM144 plasmid^[11].

Although different routes of administration were used, the similarities between the transgene expression profiles after multiple close administrations suggest that common cellular mechanisms could be involved. It is likely that the transfected cells are occupied by the previous dose and became resistant, at least in part, to a second treatment. The systemic transfection procedure, where the lipoplexes have to cross the endothelium, may also lead to a healing phenomenon occurs, leading to accumulation of fibroblasts which thus act as an additive barrier to gene transfer agents.

CONCLUSION

The results reported above strongly invite to further develop non-viral formulations, as well as tools and methods to follow the physiological response to transfection, and particularly after closely repeated injections. Such elements would help considerably to find the suitable conditions for a sustained transgene expression in the target cells, without having to resort to integrating DNA vectors.

ACKNOWLEDGMENTS

Mattias Lindberg was recipient of a doctoral fellowship from "Conseil Régional de Bretagne". This work was also supported by grants from INSERM, Institut Fédératif de Recherche de Brest (IFR 148 ScInBioS), "Association Française contre les Myopathies" (AFM, Evry, France), "Vaincre La Mucoviscidose" (Paris, France), and "Association de transfusion sanguine et de biogénétique Gaétan Saleün" (Brest, France).

BIBLIOGRAPHY

1. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K. & Farokhzad, O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* **5**, 505–515 (2008).
2. 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* **8**, 296–312 (2008).
3. Le Gall, T., Loizeau, D., Picquet, E., Carmoy, N., Yaouanc, J. J., Burel-Deschamps, L., Delepine, P., Giamarchi, P., Jaffres, P. A., Lehn, P. & Montier, T. A novel cationic lipophosphoramidate with diunsaturated lipid chains: synthesis, physicochemical properties, and transfection activities. *J Med Chem* **53**, 1496–508 (2010).
4. 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* **33**, 6240–6253 (2012).
5. Rawlins, E. L. & Hogan, B. L. M. Ciliated epithelial cell lifespan in the mouse trachea and lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **295**, 231–234 (2008).
6. Herzog, R. W., Cao, O. & Srivastava, A. Two decades of clinical gene therapy--success is finally mounting. *Discov Med* **9**, 105–111 (2010).
7. Gill, D. R., Pringle, I. A. & Hyde, S. C. Progress and prospects: the design and production of plasmid vectors. *Gene Ther.* **16**, 165–171 (2009).

8. Gill, D. R., Smyth, S. E., Goddard, C. A., Pringle, I. A., Higgins, C. F., Colledge, W. H. & Hyde, S. C. Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1alpha promoter. *Gene Ther.* **8**, 1539–1546 (2001).
9. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. & Akira, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740–745 (2000).
10. 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., Chan, M., Li, H., Yew, N. S., Cheng, S. H., Boyd, A. C., Davies, J. C., Griesenbach, U., Porteous, D. J., Sheppard, D. N., Munkonge, F. M., et al. CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat Biotechnol* **26**, 549–551 (2008).
11. 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., Sumner-Jones, S. G. & Gill, D. R. The use of CpG-free plasmids to mediate persistent gene expression following repeated aerosol delivery of pDNA/PEI complexes. *Biomaterials* **33**, 5618–5627 (2012).
12. Paillard, F. Promoter attenuation in gene therapy: causes and remedies. *Hum. Gene Ther.* **8**, 2009–2010 (1997).
13. Qin, L., Ding, Y., Pahud, D. R., Chang, E., Imperiale, M. J. & Bromberg, J. S. Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression. *Hum. Gene Ther.* **8**, 2019–2029 (1997).
14. Kuriyama, S., Sakamoto, T., Kikukawa, M., Nakatani, T., Toyokawa, Y., Tsujinoue, H., Ikenaka, K., Fukui, H. & Tsujii, T. Expression of a retrovirally transduced gene under control of an internal housekeeping gene promoter does not persist due to methylation and is restored partially by 5-azacytidine treatment. *Gene Ther.* **5**, 1299–1305 (1998).
15. Chen, Z. Y., He, C. Y., Meuse, L. & Kay, M. A. Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo. *Gene Ther.* **11**, 856–864 (2004).
16. Chen, Z.-Y., Riu, E., He, C.-Y., Xu, H. & Kay, M. A. Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol. Ther.* **16**, 548–556 (2008).
17. Haase, R., Argyros, O., Wong, S.-P., Harbottle, R. P., Lipps, H. J., Ogris, M., Magnusson, T., Vizoso Pinto, M. G., Haas, J. & Baiker, A. pEPito: a significantly improved non-viral episomal expression vector for mammalian cells. *BMC Biotechnol.* **10**, 20 (2010).
18. Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M. & Schübeler, D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* **39**, 457–466 (2007).
19. Grassi, G., Maccaroni, P., Meyer, R., Kaiser, H., D'Ambrosio, E., Pascale, E., Grassi, M., Kuhn, A., Di Nardo, P., Kandolf, R. & Küpper, J.-H. Inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation activate cytomegalovirus promoter-controlled reporter gene expression in human glioblastoma cell line U87. *Carcinogenesis* **24**, 1625–1635 (2003).
20. Kong, Q., Wu, M., Huan, Y., Zhang, L., Liu, H., Bou, G., Luo, Y., Mu, Y. & Liu, Z. Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic pigs. *PLoS ONE* **4**, 66-79 (2009).

21. Brooks, A. R., Harkins, R. N., Wang, P., Qian, H. S., Liu, P. & Rubanyi, G. M. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* **6**, 395–404 (2004).
22. 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* **146**, 99–105 (2010).
23. Magnusson, T., Haase, R., Schleeff, M., Wagner, E. & Ogris, M. Sustained, high transgene expression in liver with plasmid vectors using optimized promoter-enhancer combinations. *J Gene Med* **13**, 382–391 (2011).
24. Li, S., Tseng, W. C., Stolz, D. B., Wu, S. P., Watkins, S. C. & Huang, L. Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. *Gene Ther.* **6**, 585–594 (1999).
25. McLean, J. W., Fox, E. A., Baluk, P., Bolton, P. B., Haskell, A., Pearlman, R., Thurston, G., Umemoto, E. Y. & McDonald, D. M. Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice. *Am. J. Physiol.* **273**, 387–404 (1997).
26. 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* **85**, 612–618 (1996).
27. Delépine, P., Guillaume, C., Montier, T., Clément, J. C., Yaouanc, J. J., Des Abbayes, H., Berthou, F., Le Pape, A. & Férec, C. Biodistribution study of phosphonolipids: a class of non-viral vectors efficient in mice lung-directed gene transfer. *J Gene Med* **5**, 600–608 (2003).
28. Mian, A., Guenther, M., Finegold, M., Ng, P., Rodgers, J. & Lee, B. Toxicity and adaptive immune response to intracellular transgenes delivered by helper-dependent vs. first generation adenoviral vectors. *Mol. Genet. Metab.* **84**, 278–288 (2005).
29. Jeon, Y. H., Choi, Y., Kang, J. H., Kim, C. W., Jeong, J. M., Lee, D. S. & Chung, J.-K. Immune response to firefly luciferase as a naked DNA. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 781–786 (2007).
30. Rudolph, C., Schillinger, U., Ortiz, A., Plank, C., Golas, M. M., Sander, B., Stark, H. & Rosenecker, J. Aerosolized nanogram quantities of plasmid DNA mediate highly efficient gene delivery to mouse airway epithelium. *Mol. Ther.* **12**, 493–501 (2005).
31. Davies, L. A., Seguela, C., Varathalingam, A., Cheng, S. H., Hyde, S. C. & Gill, D. R. Identification of transfected cell types following non-viral gene transfer to the murine lung. *J Gene Med* **9**, 184–96 (2007).
32. Davies, L. A., McLachlan, G., Sumner-Jones, S. G., Ferguson, D., Baker, A., Tennant, P., Gordon, C., Vrettou, C., Baker, E., Zhu, J., Alton, E. W. F. W., Collie, D. D. S., Porteous, D. J., Hyde, S. C. & Gill, D. R. Enhanced lung gene expression after aerosol delivery of concentrated pDNA/PEI complexes. *Mol. Ther.* **16**, 1283–1290 (2008).
33. Dif, F., Djediat, C., Alegria, O., Demeneix, B. & Levi, G. Transfection of multiple pulmonary cell types following intravenous injection of PEI-DNA in normal and CFTR mutant mice. *J Gene Med* **8**, 82–89 (2006).
34. Li, S. & Huang, L. In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther.* **4**, 891–900 (1997).

35. Bazzani, R. P., Cai, Y., Hebel, H. L., Hyde, S. C. & Gill, D. R. The significance of plasmid DNA preparations contaminated with bacterial genomic DNA on inflammatory responses following delivery of lipoplexes to the murine lung. *Biomaterials* **32**, 9854–9865 (2011).
36. Tan, Y., Li, S., Pitt, B. R. & Huang, L. The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo. *Hum. Gene Ther.* **10**, 2153–2161 (1999).
37. 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.* **12**, 685–96 (2001).
38. 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* **71**, 303–9 (2009).
39. 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* **97**, 3074–3083 (2008).
40. 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* **7**, 1526–1533 (2005).
41. 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.* **9**, 463–471 (2002).
42. Song, Y. K., Liu, F., Chu, S. & Liu, D. Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration. *Hum. Gene Ther.* **8**, 1585–1594 (1997).
43. Wiseman, J. W., Goddard, C. A., McLelland, D. & Colledge, W. H. A comparison of linear and branched polyethylenimine (PEI) with DCChol/DOPE liposomes for gene delivery to epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **10**, 1654–1662 (2003).
44. Dames, P., Ortiz, A., Schillinger, U., Lesina, E., Plank, C., Rosenecker, J. & Rudolph, C. Aerosol gene delivery to the murine lung is mouse strain dependent. *J. Mol. Med.* **85**, 371–378 (2007).

III. Les lipothiophosphoramidates pour le transfert de gènes : rôle crucial de la tête polaire cationique

Au cours de sa thèse, Aurore Fraix (équipe « Phosphore et vectorisation » ; CNRS UMR 6521) a synthétisé des vecteurs phospholipidiques soufrés dans le but de trouver un compromis entre la capacité à former, une fois associés au plasmide, une construction suffisamment robuste pour surmonter les contraintes extracellulaires, mais également suffisamment instable pour être dissociée une fois internalisée dans les cellules.

La tête cationique ammonium avait tout d'abord été préférée, d'une part pour des raisons synthétiques (plus facile à introduire), et d'autre part afin de disposer de composés pouvant être comparés avec les lipophosphoramides (capacité de vectorisation et propriétés physicochimiques)^[531]. Si les efficacités de transfection *in vitro* obtenues avec ces nouveaux composés soufrés étaient déjà intéressantes, notamment à des faibles rapports de charges, l'utilisation de motifs polaires triméthylphosphonium et triméthylarsonium pouvaient, à l'instar des lipophosphoramidates, permettre de diminuer leur toxicité tout en conservant, voire améliorant l'efficacité de transfection^[355,524]. Par conséquent, une famille de lipothiophosphoramidates possédant un espaceur à deux carbones (par analogie avec le KLN47) et une tête arsonium ou phosphonium ont été synthétisés et évalués.

Les résultats de transfection sur différentes lignées cellulaires humaines (HeLa, A549 and 16HBE14o-) présentés dans l'article ci-après, montrent que le remplacement de la tête polaire ammonium peut conduire à des efficacités de transfection élevées, à nouveau dès les plus faibles rapports de charges. Au travers des résultats présentés, il apparaît que la tête polaire triméthylarsonium est également particulièrement bénéfique sur les composés de la famille des lipothiophosphoramidates, et qu'elle pourrait par conséquent l'être également pour d'autres familles de vecteurs non viraux.

Suite aux résultats présentés dans l'article ci-après, nous verrons dans un second temps les résultats obtenus lors d'essais préliminaires de transfection *in vivo*, par différentes voies d'administrations, en utilisant des lipothiophosphoramidates sélectionnés, ainsi que le lipophosphoramidate KLN47, cette fois-ci avec le plasmide rapporteur pGM144.

“Lipothiophosphoramidates for gene delivery: critical role of the cationic polar headgroup”
(Fraix A *et al.*, *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2012 Mar; **10**(10):2051-2058)

IV. Evaluation d'une sélection de lipothiophosphoramidates ainsi que du lipophosphoramidate KLN47 pour le transfert de gènes à destination du poumon *in vivo*

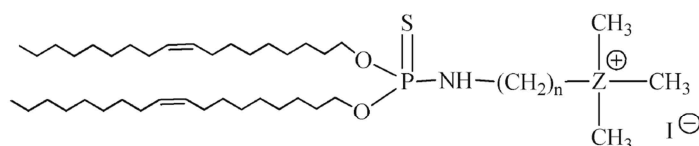
Afin d'évaluer plus finement les relations structures/activités de transfection des lipothiophosphoramidates, et surtout chez l'animal, nous avons poursuivi les investigations en avec les composés les plus adaptés à une utilisation *in vivo*. Ainsi, notre but était dans un premier temps de sélectionner un ou plusieurs composés soufrés afin de comparer leurs efficacités de transfection avec le lipophosphoramidate KLN47, après injection par voie intraveineuse chez la souris Swiss, en utilisant le plasmide rapporteur pGM144 codant la luciférase (dont la persistance d'expression au niveau pulmonaire a été montrée précédemment).

Dans l'optique d'une thérapie génique de la mucoviscidose, notre but était dans un second temps d'évaluer les capacités de transfection par administration directe dans les voies hautes des animaux. Ainsi, en plus de devoir être efficaces *in vitro*, les composés sélectionnés se devaient de complexer l'ADN à faible rapport de charges, de façon à pouvoir condenser la totalité de l'ADNp dans un volume restreint, qui ne conduirait pas à noyer les animaux.

Une partie des travaux présentés par la suite sont le fruit du stage d'Adeline Kerviel (Master 2 Recherche), que j'ai partiellement encadré lors de son stage au sein de notre équipe.

1. Caractéristiques des lipides cationiques testés

Six vecteurs de synthèse ont été évalués lors de ces travaux, tous étant des lipides cationiques originaux synthétisés par l'unité UMR CNRS 6521. Ces différents composés, caractérisés dans les chapitres précédents du manuscrit, possèdent un même domaine hydrophobe composé de deux chaînes oléiques (C18 :1) mais diffèrent quant à la nature de leur tête cationique et de leur bras espaceur. Le KLN47 est le seul composé non soufré de l'étude, et possède une tête arsonium et un espaceur à deux carbones ([Figure 52](#), page 111). Les structures des lipothiophosphoramidates étudiés sont quant à elles rappelées dans la [Figure 61](#).



2 (BSV17)	n = 2 ; Z = N
3 (BSV44)	n = 3 ; Z = N
6a (BSV14)	n = 2 ; Z = P
6b (BSV28)	n = 3 ; Z = P
7 (BSV21)	n = 2 ; Z = As

Figure 61 : Structures chimiques des lipothiophosphoramidates ^[539]

Les résultats d'efficacité de transfection et de toxicité *in vitro* (sur cellules A549, HeLa, CFBE41o- et 16HBE14o-) des lipides soufrés ne sont pas exposés ici, car sensiblement similaires à ceux présentés dans la partie précédente du manuscrit^[539]. Rappelons juste que les lipothiophosphoramidates ont une efficacité de transfection très intéressante *in vitro*, car elle est élevée (égale voire supérieure à celle du KLN47) dès les faibles rapports de charges (CR 2). Suite à ce premier criblage, deux composés ont été sélectionnés pour leur évaluation *in vivo* : le BSV14 et le BSV44. Le KLN47, de part sa forte efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo*, a été intégré dans les protocoles comme référence. La lipofectamine a été utilisée dans les expériences de complexation comme contrôle.

1.1. Tailles et potentiels zêta des liposomes.

Les mesures de taille et de potentiel zêta des différentes formulations ont été réalisées à l'unité UMR CNRS 6521. Si le BSV14 a pu être formulé de manière « classique » (hydratation de film lipidique), le BSV44, sans doute davantage hydrophobe, a du être formulé par injection éthanolique afin d'être suffisamment concentré pour l'expérimentation *in vivo* (voir Matériels & Méthodes). Les concentrations liposomales des différentes formulations utilisées varient entre 5 et 6 mM. Les caractéristiques physicochimiques sont proches de celles présentées dans le chapitre précédent, la taille moyenne des liposomes BSV44 obtenus par injection éthanolique étant légèrement supérieure celle décrite précédemment (400 nm).

2. Capacités de complexation du BSV14, BSV44 et du KLN47 dans différentes conditions

Afin de pouvoir cibler les conditions à tester *in vivo*, les capacités de complexation des lipothiophosphoramidates ont été évaluées par mesure d'exclusion du BET et migration sur gel d'agarose, à 6 CRs différents (allant de 0 à 8) et sous trois conditions : en eau, en glucose et en présence d'un stabilisateur stérique (MPEG2000-DSPE).

2.1. Capacités de complexation en présence de glucose

Comme les lipothiophosphoramidates sont moins solubles dans l'eau que les lipophosphoramidates, et qu'ils précipitent en présence de sels, leur capacité à complexer l'ADN dans une solution de glucose iso-osmotique a aussi été testée ([Figure 62](#) et [Figure 63](#)).

La [Figure 62](#) présente une comparaison entre les capacités de complexation des lipothiophosphoramidates retenus pour l'évaluation *in vivo*, en eau et en glucose 5 %.

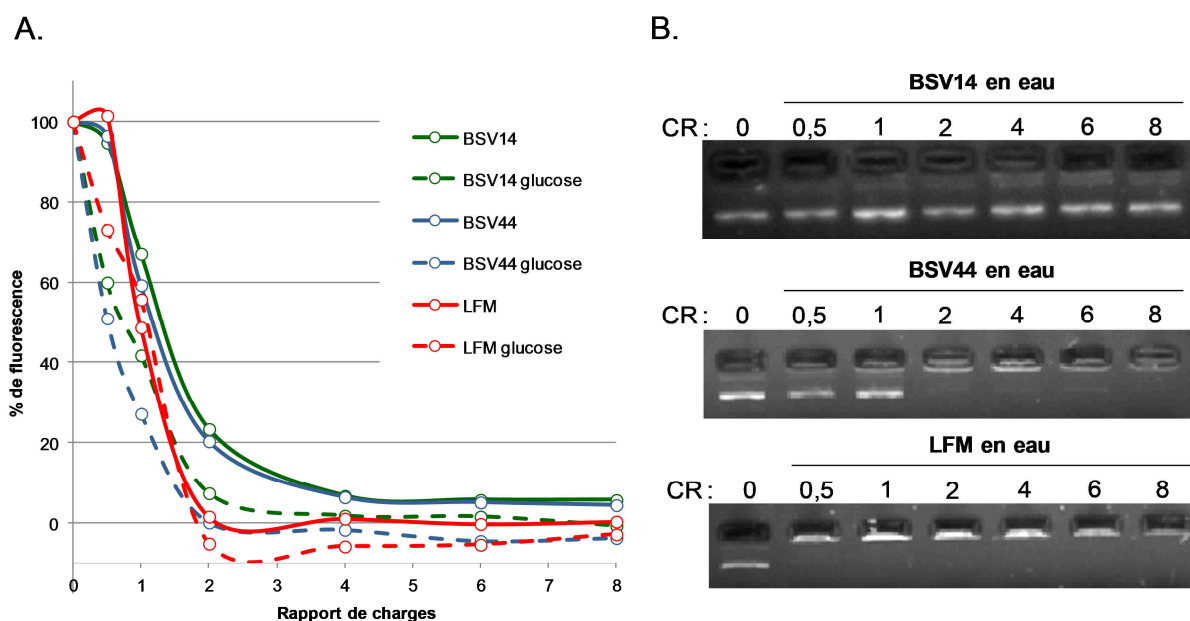


Figure 62 : (A) Influence du glucose sur la capacité de complexation des lipides BSV14, BSV44 et lipofectamine (LFM) mesurée par exclusion du BET à différents rapports de charges (CR). (B) Capacités de complexation des trois mêmes lipides en eau, visualisées par migration sur gel d'agarose

On observe tout d'abord que la complexation semble être améliorée en présence de glucose pour chacun des lipides cationiques testés ([Figure 62A](#)), l'ADN étant totalement condensé dès le rapport 2 pour chacun d'entre eux. En revanche, le « plateau de fluorescence », signifiant l'exclusion totale du BET des acides nucléiques car condensés par les lipides cationiques, n'est atteint qu'au CR 4 pour les composés BSV14 et BSV44 en eau. Bien que ces résultats laissent penser que ces deux derniers composés condensent l'ADNp de façon similaire, la migration des produits de complexation montre que le BSV14 ne permet pas de condenser la totalité de l'ADN aux CRs testés puisqu'il reste encore de l'ADN libre au CR 8 ([Figure 62B](#)). Cela signifie que ce composé interagit avec l'ADN (puisque'il y a exclusion totale du BET), mais pas suffisamment fortement, car une fraction des acides nucléiques reste tout de même capable de migrer sous l'influence d'un champ électrique. Comme les lipides cationiques doivent être

capables de complexer l'ADN à faible CR pour une délivrance par les voies aériennes (de façon à délivrer un volume minimal de complexes), nous n'avons pas poursuivi les tests de complexation en présence d'un stabilisateur dans la formulation du BSV14.

2.2. Capacités de complexation avec un stabilisateur stérique

Les injections par les voies hautes (permettant de cibler directement l'épithélium respiratoire) nécessitent l'utilisation de stabilisateurs stériques comme le MPEG2000-DSPE afin de réduire les interactions électrostatiques des complexes et ainsi éviter leur agrégation. Il est donc nécessaire de connaître, en présence d'une masse optimale de stabilisateur (5 fois la masse d'ADN à complexer) ^[540], le CR minimal pour lequel l'ADN est totalement complexé.

Par mesure d'exclusion du BET, nous observons tout d'abord que la capacité de complexation du BSV44 est équivalente en présence ou non de stabilisateur, l'ADN étant fortement complexé au CR 2, et totalement dès le CR 3 (Figure 63A). Concernant le lipophosphoramidate KLN47, l'ADN semble totalement complexé dès le CR 1, que ce soit en eau ou en glucose 5 %, et dès le CR 2 en présence de stabilisateur.

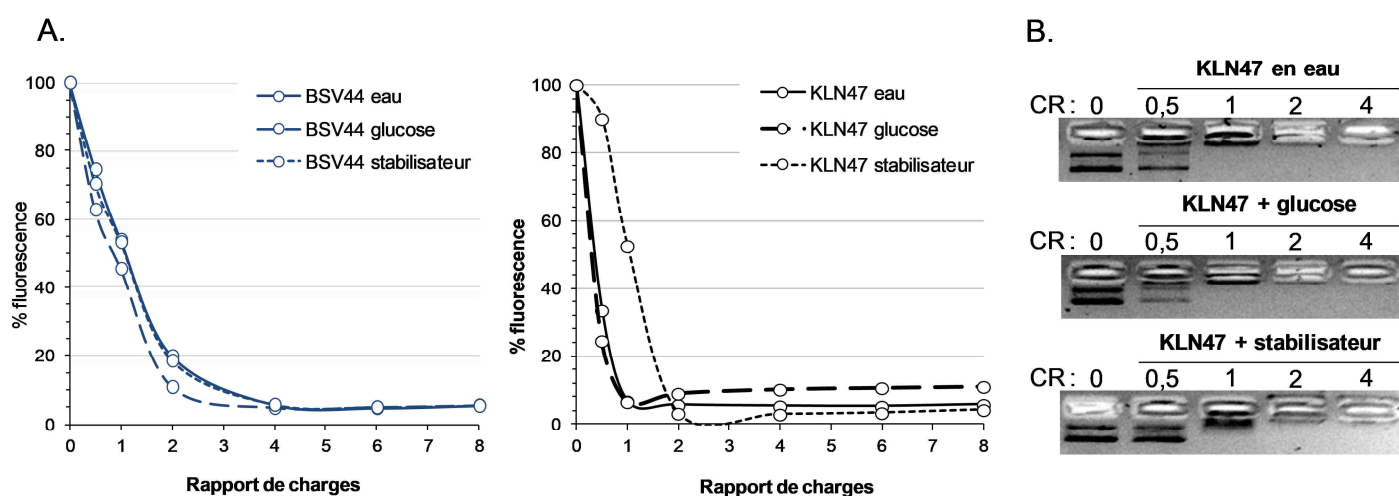


Figure 63 : Influences du stabilisateur MPEG2000-DSPE et du glucose (5%) sur la capacité de complexation du lipothiophosphoramidate BSV44 et du lipophosphoramidate KLN47, évaluées par exclusion du BET (A), et également par migration sur gel d'agarose pour le KLN47 (B)

Suite à ces observations, il a été choisi d'utiliser un rapport de charges égal à 4 pour une délivrance intraveineuse des lipoplexes formés de BSV14, BSV44 et KLN47, permettant la totale complexation de l'ADN dans les différentes conditions. En revanche, pour les administrations par les voies hautes, il a été choisi un CR égal à 2, permettant de complexer la

majorité (BSV44) ou la totalité (KLN47) de l'ADNp, et d'administrer un volume de lipoplexes acceptable (limitant le risque de noyade).

3. Efficacité de transfection des lipoplexes *in vivo*

La mesure de l'efficacité de transfection des lipoplexes est réalisée à l'aide de l'appareil de bioluminescence NightOwl (Berthold) qui permet la détection des photons émis lors de l'oxydation de la luciférine, réaction catalysée par la luciférase. L'effet toxique des lipides cationiques utilisés est quant à lui évalué par l'activité des transaminases hépatiques dans le plasma des souris traitées.

3.1. Transfection par voie intraveineuse

3.1.1. Efficacités de transfection

De façon à évaluer l'impact du glucose et celui de l'agrégation des lipoplexes (causée par l'ajout de NaCl) sur l'efficacité de transfection des lipothiophosphoramidates ainsi que sur la toxicité induite, nous avons testé trois conditions de complexation différentes : NaCl 0,9 %, glucose 5 % ou glucose 25 %. La masse d'ADNp, le volume administré à chaque souris, ainsi que le rapport de charges utilisé, étaient en revanche les mêmes pour chacune des conditions testées (CR4, 50 µg d'ADN dans 300 µL). Les mesures de bioluminescence ont été effectuées à intervalles réguliers : au départ tous les jours, puis, selon les lipides, tous les deux jours jusqu'à tous les sept jours, avec un maximum de 46 jours post-injection pour une souris du groupe KLN47.

Les trois formulations testées, à base de KLN47, BSV14 et BSV44, se sont avérées avoir des efficacités de transfection différentes. Lors d'essais préliminaires avec le BSV14, les acquisitions de bioluminescence réalisées à la suite d'injections en glucose 5 % ont montré une faible expression du transgène chez les deux animaux traités, localisée uniquement au niveau de la rate, et s'éteignant deux jours après l'administration (données non présentées). Ce résultat est sans doute lié au faible niveau de complexation de ce composé, observé précédemment. En conséquence, les tests ont été arrêtés pour cette molécule.

Le témoin considéré comme positif pour les tests *in vivo* est le KLN47, car la lipofectamine ne possède aucun pouvoir transfectant chez l'animal. Si ce lipophosphoramidate a déjà prouvé son efficacité *in vivo* [529], c'est la première fois qu'il est utilisé avec le plasmide CpG-free pGM144. Les signaux de bioluminescence obtenus après injection de lipoplexes à base de KLN47 montrent une cinétique d'expression du transgène au niveau pulmonaire globalement similaire aux résultats obtenus avec son analogue di-insaturé BSV4 (voire page 140), à savoir une expression stable pendant environ 24 jours, et disparaissant par la suite (Figure 64). Si le niveau d'expression est plus fort pendant la première semaine suivant l'administration de lipoplexes en NaCl 0,9 %, les niveaux semblent s'équilibrer par la suite ($\approx 4 \times 10^5$ ph/sec à J+9 ; Figure 64). De façon curieuse, une souris ayant reçu les lipoplexes en glucose 25 % maintint une expression du transgène jusqu'à 46 jours après l'injection.

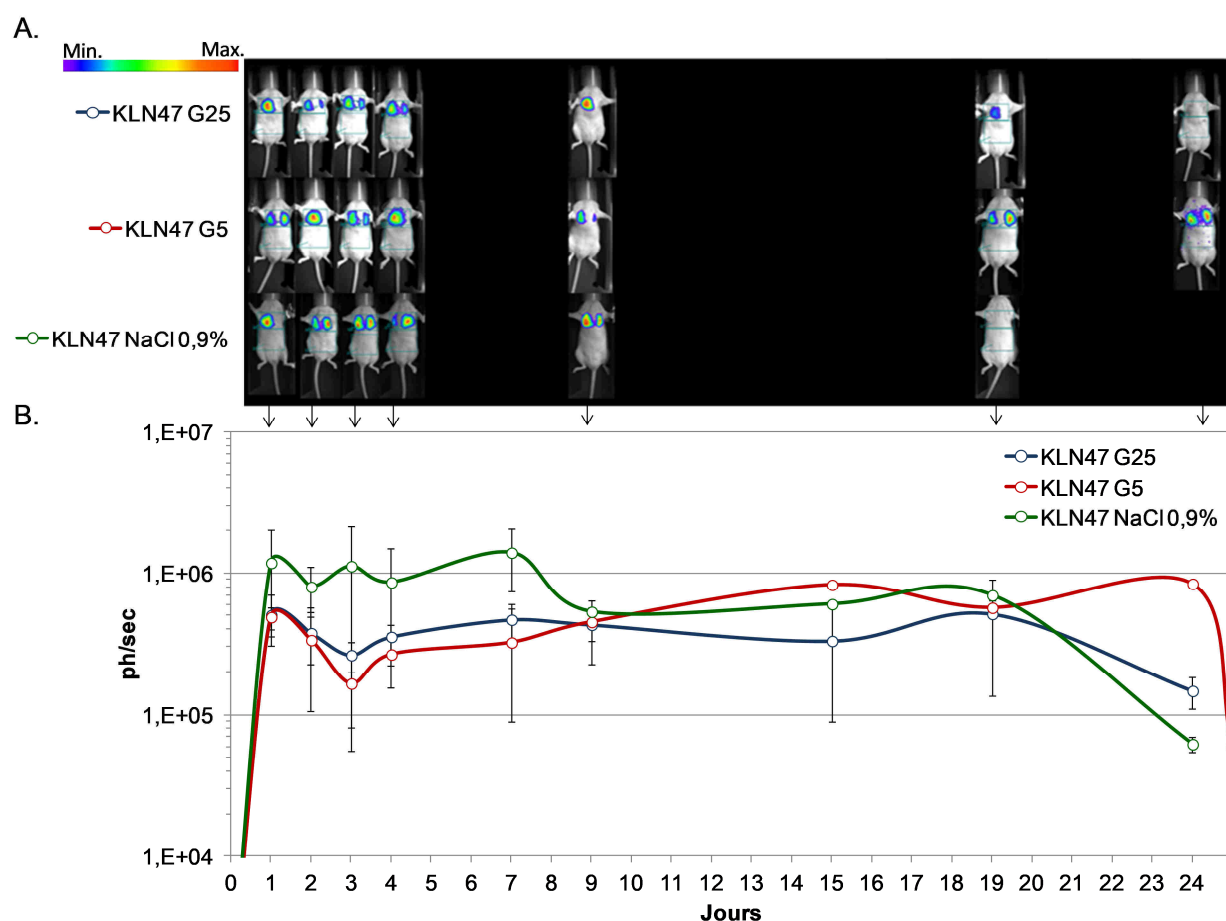


Figure 64 : Cinétique de bioluminescence *in vivo* après injection intraveineuse, chez la souris, de lipoplexes KLN47/pGM144 préparés en NaCl 0,9 % (n=3), en glucose 5 % (noté G5 ; n=3) ou en glucose 25 % (noté G25 ; n=3). (A) Signaux de bioluminescence obtenus sur une souris représentative de chaque groupe. (B) Quantification des signaux de bioluminescence en photons par seconde (ph/sec) à différents temps après injection des lipoplexes

Le lipothiophosphoramidate BSV44, possédant un espaceur à trois carbones et une tête polaire ammonium, permet également d'obtenir une forte expression du transgène au niveau pulmonaire dès le lendemain de l'administration des lipoplexes (Figure 65). Si les niveaux d'expression initiaux sont alors presque identiques que les lipoplexes soient injectés en sels ou en glucose, les cinétiques d'expression sont néanmoins différentes. En NaCl (courbe verte ; Figure 65B), l'expression du transgène n'est détectable que pendant 8 jours, avec un pic d'expression le lendemain de l'injection. En revanche, les lipoplexes injectés en glucose (5 et 25 %) donnent quant à elles lieux à des cinétiques d'expression plus longues. En effet, après un pic d'expression (entre 4×10^6 et 10^7 ph/sec, supérieur à celui obtenu avec le KLN47) deux jours après administration des lipoplexes, les niveaux décroissent progressivement pour disparaître entre le 18^{ème} (BSV44 G25) et le 25^{ème} jour (BSV44 G5). En raison du trop faible nombre d'animaux traités, et des variations liées à la quantification de l'activité luciférase par bioluminescence, il reste néanmoins difficile de conclure sur une quelconque influence de la concentration en glucose sur la durée d'expression.

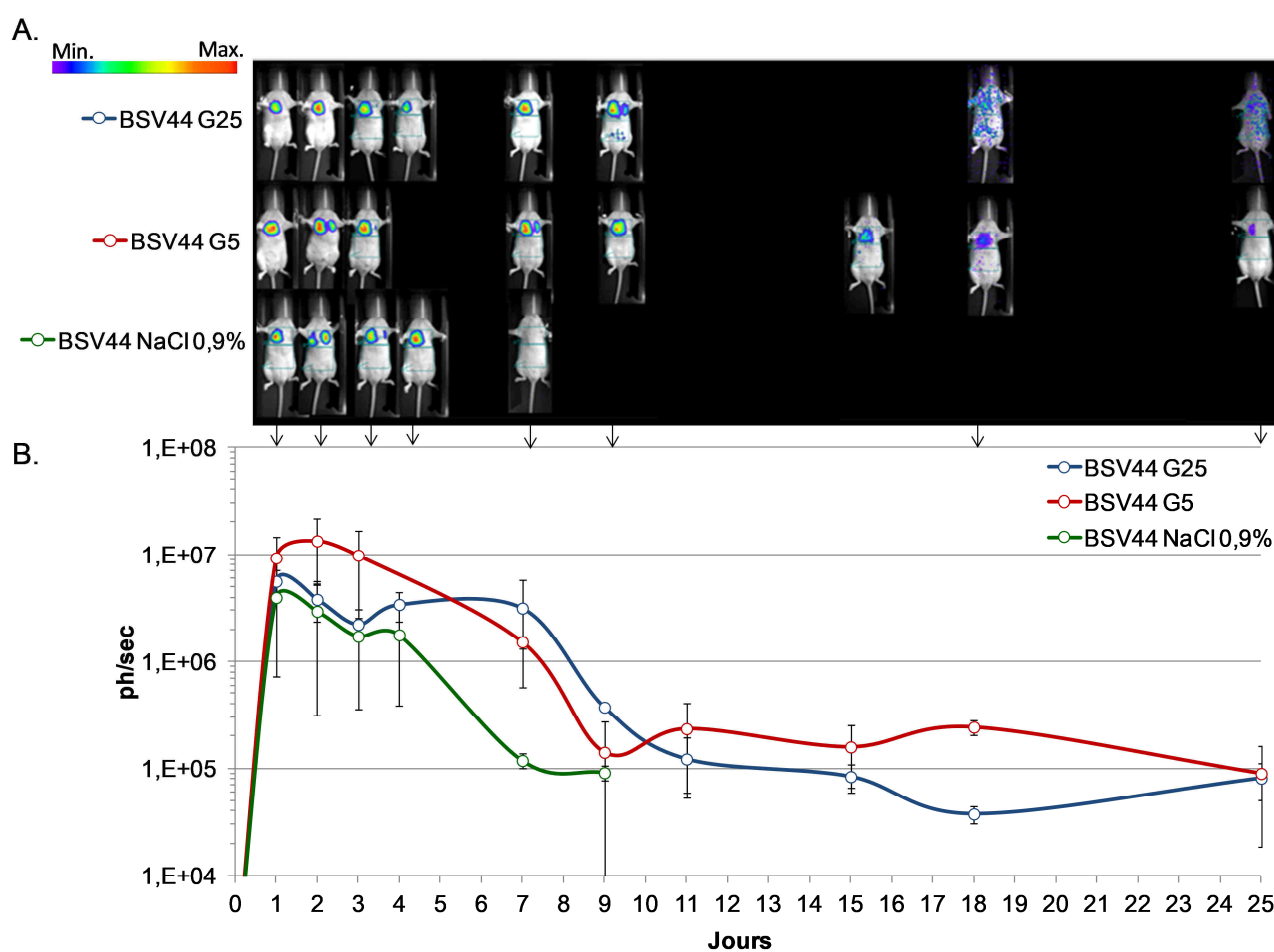


Figure 65 : Cinétique de bioluminescence *in vivo* après injection intraveineuse, chez la souris, de lipoplexes BSV44/pGM144 préparés en NaCl 0,9 %, en glucose 5 % (noté G5) ou en glucose 25 % (noté G25). (A) Signaux de bioluminescence obtenus sur une souris représentative de chaque groupe. (B) Quantification des signaux de bioluminescence en photons par seconde (ph/sec) à différents temps après injection des lipoplexes

3.1.2. Atteinte hépatique

Si toutes les souris incluses dans les différents protocoles ont survécu, à l'exception de l'une entre elles ayant reçu des lipoplexes à base de BSV44 en condition glucose 5 % (décédée deux jours après l'administration), les souris étaient ébouriffées et prostrées pendant les deux à trois jours post-administration, puis recouvrèrent un phénotype absolument normal (aucune d'entre elle n'a perdu de poids durant la durée de l'expérience).

Comme nous avons vu dans les chapitres précédents que l'administration intraveineuse de lipoplexes conduisait généralement à une atteinte hépatique transitoire, nous avons évalué ce phénomène par dosage de l'activité des transaminases dans le plasma de chacune des souris traitées et suivies par bioluminescence.

Quelque soit le lipide et la condition testée, on observe à nouveau une élévation globale et transitoire du niveau des transaminases durant les premiers jours faisant suite à l'administration des lipoplexes (Figure 66). Cette augmentation dure environ deux jours, avec un pic à J+1 dans le cas des ASAT et notamment à J+2 dans le cas des ALAT en condition NaCl. Ensuite, les activités enzymatiques diminuent jusqu'à retrouver leur valeur de base 3 à 7 jours plus tard. La toxicité engendrée par le BSV44 semble plus importante que celle engendrée par le KLN47 mais les écarts-types sont souvent très importants et ne permettent donc pas de conclure de manière significative.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec le BSV18 et le BSV4, présentés dans les chapitres précédents. Rappelons que dans chacun de ces cas, l'injection des liposomes ne conduisait à aucune atteinte hépatique.

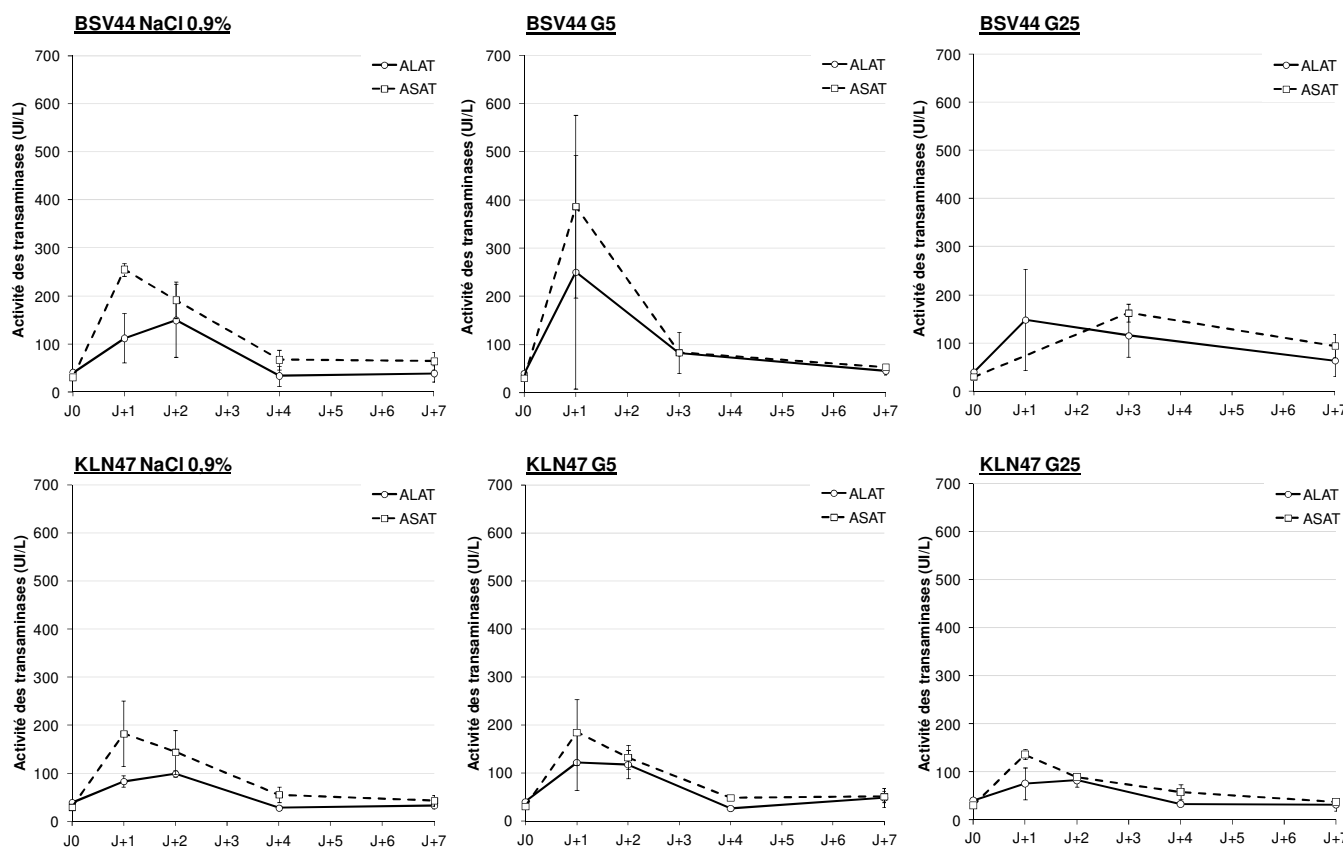


Figure 66 : Cinétique d'activité des transaminases (ALAT et ASAT) chez la souris, après administration intraveineuse de lipoplexes KLN47/pGM144 ou BSV44/pGM144 en solution salée isotonique (NaCl 0,9 %), en glucose 5 % (G5) ou glucose 25% (G25)

3.2. Transfection par voie locale

L'administration intratrachéale est une voie de choix lorsque, comme dans la mucoviscidose, on cherche à corriger les cellules épithéliales de l'appareil respiratoire.

Chez l'animal, les administrations par voie intratrachéale sont plus délicates à réaliser d'un point de vue technique que celles par voie intraveineuse. Elles sont également plus aléatoires en raison des nombreuses variables liées à l'animal lui-même (volume des poumons, rythme respiratoire, ...). Ceci peut mener, dans le meilleur des cas, au reflux d'une partie de la solution administrée dans l'œsophage ou à un dépôt plus important dans un lobe pulmonaire que dans l'autre, et dans le pire des cas à la mort quasi instantanée de l'animal par noyade. Comme décrit dans la partie Matériels & Méthodes, les souris sont tout d'abord anesthésiées par administration IP d'un mélange kétamine/xylazine. Elles sont ensuite disposées sur le dos (à la verticale) et leur langue est maintenue sur le côté afin de rendre la trachée accessible et de

pouvoir y délivrer, à l'aide d'une canule, le volume de lipoplexes adéquat sans que la souris ne s'arrête de respirer.

Dans nos essais, 50 µg d'ADN plasmidique pGM144 sont complexés avec chacun des vecteurs (BSV44 et KLN47) stabilisés avec le MPEG2000-DSPE et délivrés dans un volume allant de 60 à 70 µL. Seules les solutions de lipoplexes parfaitement translucides (contenant des particules suffisamment petites pour ne pas être visibles à l'œil nu) ont été délivrées. Les mesures de tailles et de potentiel zêta n'ont été réalisées que sur les complexes à base de KLN47. Les structures formées sont de petites tailles (135 ± 17 nm), et d'un potentiel zêta proche de la neutralité ($0,4 \pm 1,13$ mV).

Au jour d'aujourd'hui, les tests effectués avec le lipothiophosphoramidate BSV44 restent uniquement des essais effectués dans le but de savoir si ce dernier pouvait transfecter l'épithélium pulmonaire par cette voie d'administration et, si oui, pendant combien de temps l'expression pouvait être observée. Ainsi, le nombre d'animaux injectés est encore faible mais, parmi ceux où l'injection des lipoplexes a entraîné une expression (n=5), aucun ne présentait d'altération, même transitoire, de son état clinique. La majorité des essais de mise au point et d'optimisation ont été réalisés avec le KLN47.

3.2.1 Efficacité de transfection

Le suivi par bioluminescence des souris ayant reçu les lipoplexes à base de BSV44 stabilisé montre un signal localisé au niveau de la trachée, dès le lendemain de l'administration, qui persiste pendant plus de 10 jours ([Figure 67](#), en haut). Cependant, si aucun signal n'est visible au niveau pulmonaire proprement dit, il est néanmoins très probable que certaines cellules aient tout de même été transfectées, mais que leur nombre soit trop faible pour que les photons émis puissent être détectés par la caméra CCD. La trachée est en effet bien plus superficielle que les poumons, ce qui explique que le signal y soit plus facilement détectable.

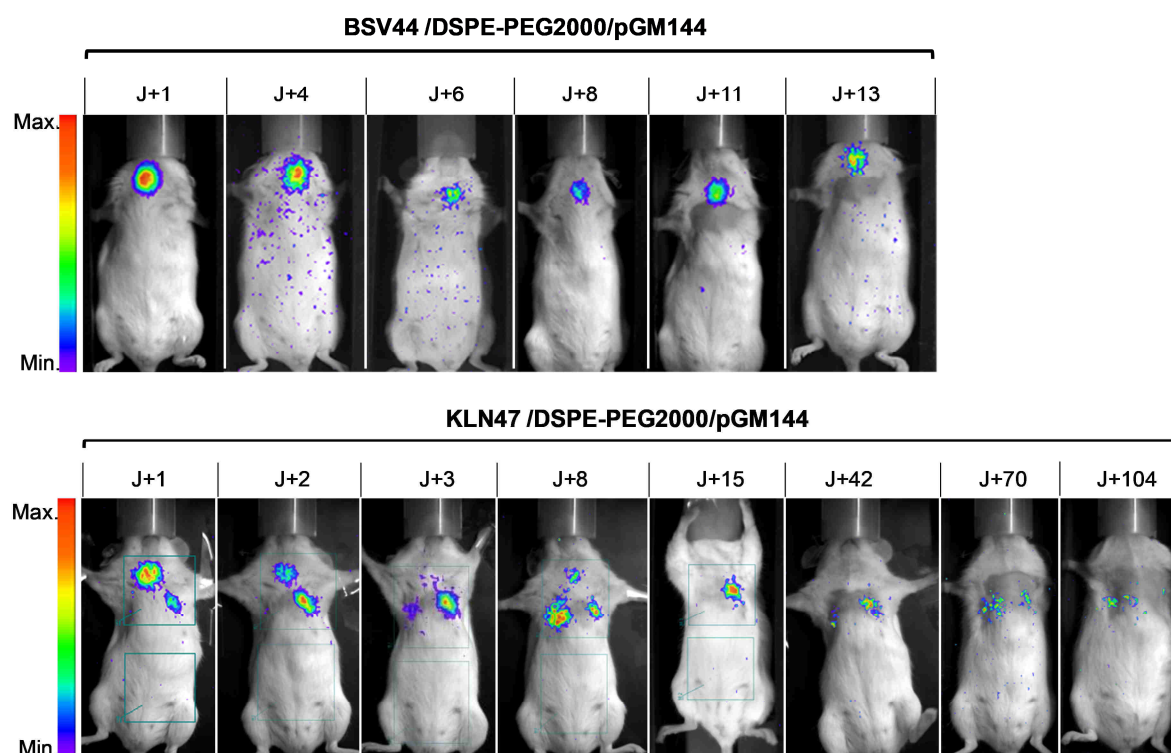


Figure 67 : Cinétique de bioluminescence *in vivo* après administration intratrachéale de lipoplexes stabilisés chez une souris de chaque groupe (BSV44/ MPEG2000-DSPE/pGM144 et KLN47/ MPEG2000-DSPE/pGM144)

Les complexes KLN47/MPEG2000-DSPE/pGM144 ont en revanche donné de meilleurs résultats. En effet, si un signal au niveau de la trachée est également observé le lendemain de l'administration, il s'accompagne généralement d'un signal au niveau d'un lobe pulmonaire. Sur l'exemple de la [Figure 67](#), le signal au niveau du lobe pulmonaire gauche devient prédominant dès le 2^{ème} jour. Puis, à partir du 3^{ème} jour post-administration, la luciférase est exclusivement localisée au niveau pulmonaire. L'intensité des signaux commence à décroître doucement au-delà de 15 jours mais reste détectable par bioluminescence jusqu'à plus de 70 jours (le dernier signal étant observé au 104^{ème} jour). Il est important de noter que le positionnement de l'animal dans l'appareil de bioluminescence a un impact direct sur la détection du signal, ce qui explique pourquoi nous avons parfois l'impression que le signal se déplace d'un lobe pulmonaire à l'autre.

Ces résultats sont intéressants car nous avons mis au point une technique permettant de d'évaluer relativement facilement la capacité de transfection des lipides cationiques par les voies hautes. De plus, la formulation à base de KLN47 semble particulièrement efficace puisqu'elle permet d'obtenir des cinétiques d'expressions proches de celles obtenues par aérosol avec la PEI ^[289] ou le GL67 ^[502] (évoquées précédemment, page 140).

3.2.2. Analyses histologiques des poumons de souris traitées avec KLN47/MPEG2000-DSPE/pGM144

Plusieurs souris exprimant la luciférase au niveau pulmonaire suite à une administration intratrachéale de lipoplexes à base de KLN47 ont été sacrifiées, et leurs poumons extraits afin d'identifier les populations cellulaires transfectées et d'évaluer la présence d'éventuelles atteintes tissulaires locales. Les analyses histologiques ont été effectuées par le personnel de la plate-forme H²P² à Rennes. Deux types de marquage ont été réalisés pour détecter la luciférase, l'un par immunohistofluorescence et l'autre par réaction immunohistoenzymatique (voir Matériels & Méthodes, page 124).

La [Figure 68](#) présente les marquages de la luciférase par immunohistofluorescence. On peut observer que les marquages sont assez dispersés, mais bel et bien localisés dans les cellules épithéliales bronchiques.

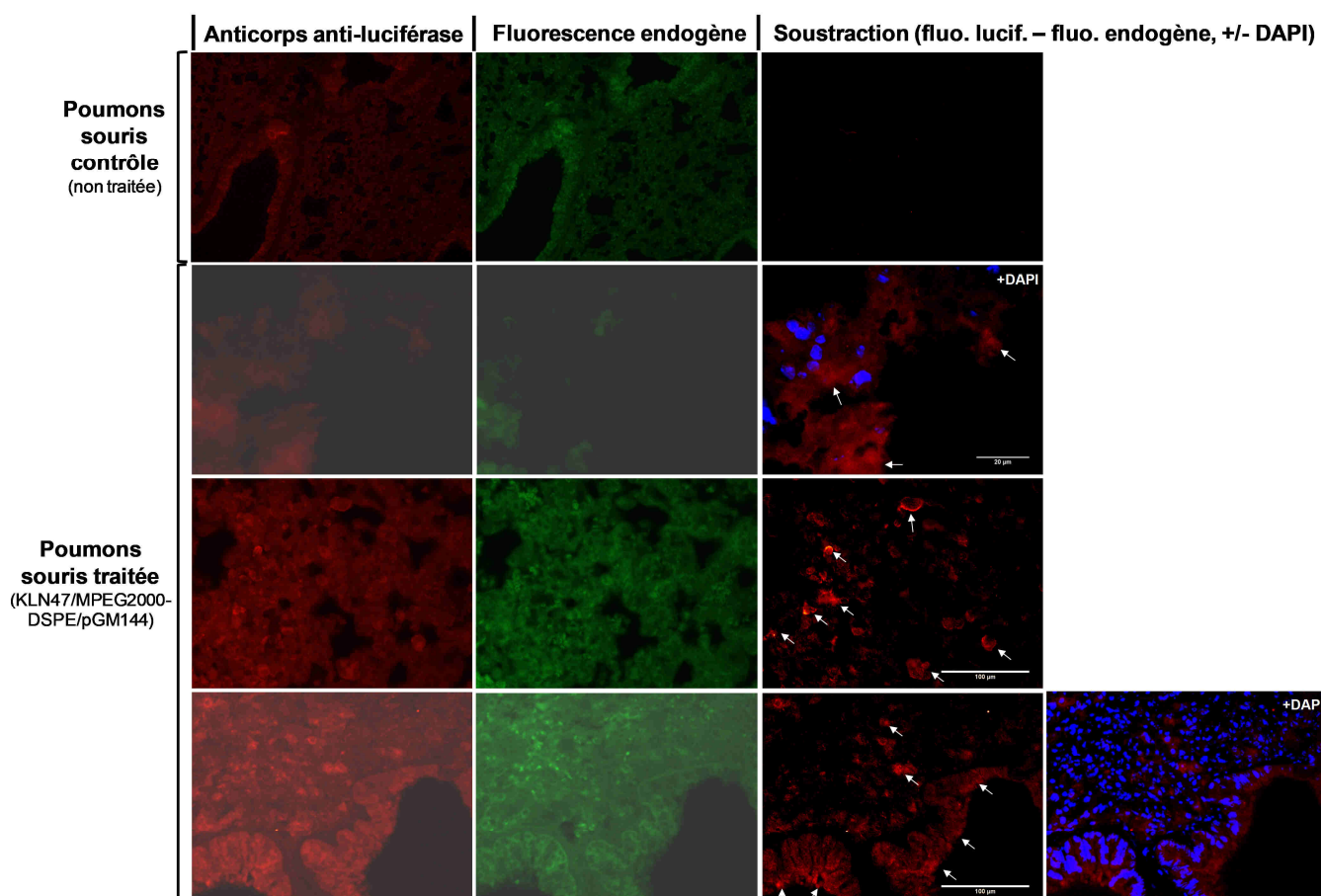


Figure 68 : Détection de la luciférase par immunohistofluorescence (flèches blanches) dans les poumons d'une souris traitée avec KLN47/MPEG2000-DSPE/pGM144, observée par microscopie à épifluorescence. Certaines coupes possèdent également un contre marquage de l'ADN nucléaire au DAPI (en bleu). La souris contrôle n'a suivi aucun protocole.

La Figure 69 (F, G) présente cette fois-ci un marquage immunohistoenzymatique de la luciférase, les colorations permettant également d'observer d'éventuelles lésions tissulaires. Ces analyses permettent de confirmer la présence de protéine luciférase dans les cellules épithéliales.

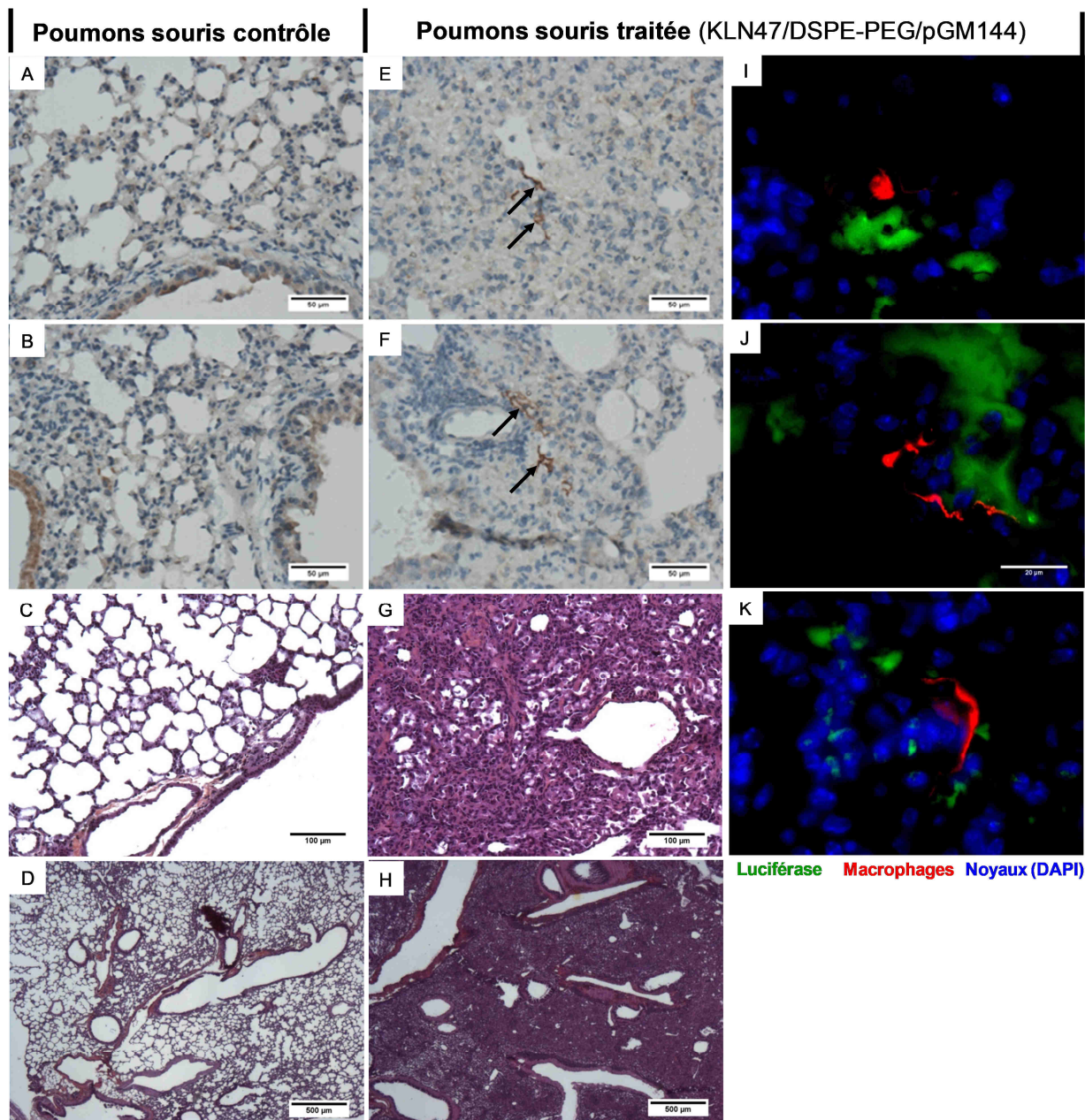


Figure 69 : Comparaison anatomopathologique entre un tissu pulmonaire sain (A-D), et celui d'une souris traitée avec KLN47/MPEG2000-DSPE/pGM144, observée par microscopie à optique (E-H). Les flèches indiquent la détection par réaction enzymatique de la luciférase. Marquages par immunofluorescence des macrophages (en rouge), de la luciférase (en vert) et de l'ADN (en bleu) sur une coupe de poumons traités (I-K)

Par comparaison entre les tissus pulmonaires d'une souris témoin (Figure 69, A-D) et ceux d'une souris traitée (Figure 69, E-H), on observe un état fortement inflammatoire du parenchyme pulmonaire chez la souris traitée. Cette réponse physiologique n'est pas

étonnante en raison du volume important de lipoplexes délivré dans les poumons. Il est cependant nécessaire de mentionner que la souris sur laquelle ont été effectuées les analyses avait justement été sacrifiée en raison de signes cliniques (perte de poids et des difficultés respiratoires). L'ensemble des autres souris incluses dans le même protocole, pour lesquelles un signal de bioluminescence équivalent avait été obtenu au niveau pulmonaire, ont par ailleurs très bien supporté le traitement (pas de différences comportementales par rapport à une souris saine). Ainsi, l'inflammation observée ici constitue probablement la réaction la plus aigüe que nous aurions pu détecter suite à ce type de traitement.

Si des cellules inflammatoires sont bien présentes dans le tissu pulmonaire des souris traitées, le marquage simultané des macrophages et de la luciférase montre que ce ne sont pas ces cellules phagocytaires qui expriment le transgène (Figure 69, I-K), la majorité d'entre elles ayant sans doute migré sur le site inflammatoire après l'étape de transfection proprement dite.

3.2.3. Atteinte hépatique

Comme une étude récente rapporte le passage rapide des nanoparticules dans la circulation sanguine après instillation intratrachéale^[541], et que l'injection intraveineuse de lipoplexes conduit à une atteinte hépatique transitoire, nous avons également quantifié l'activité des transaminases dans le plasma des souris traitées par les voies hautes avec KLN47/MPEG2000-DSPE/pGM144 (Figure 70).

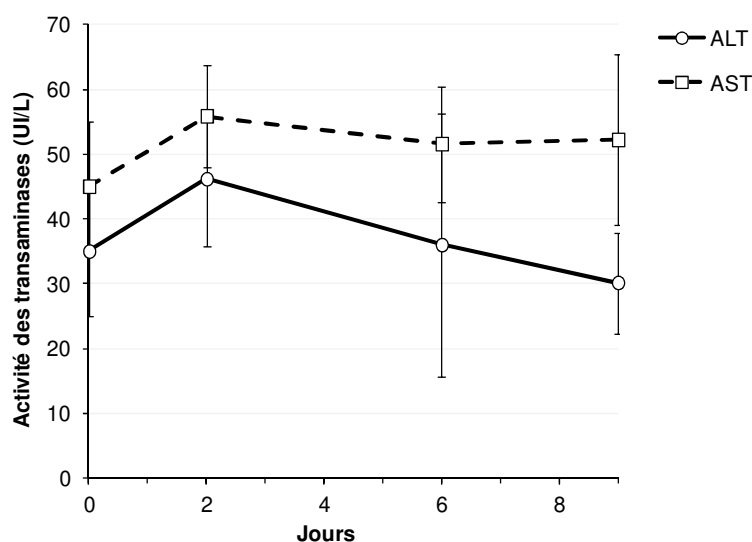


Figure 70 : Cinétique d'activité des transaminases (ALT et AST) après administration intratrachéale de lipoplexes KLN47/MPEG2000-DSPE/pGM144 (n=3).

Les mesures d'activité des enzymes hépatiques ne présentent pas de variations significatives au cours du temps suite aux instillations intratrachéales. Nous pouvons ainsi penser que les particules ne franchissent pas la barrière endothéliale ou en trop faible quantité pour pouvoir induire une toxicité hépatique, ou encore que les complexes PEGylés ne sont pas (ou peu) hépatotoxiques.

Discussion & Conclusions

Ces travaux ont été entrepris afin d'avoir une première idée du potentiel des lipothiophosphoramidates pour leur utilisation en transfert de gènes *in vivo*, en comparaison avec les composés actuels. La liaison soufrée (P=S) a été introduite afin d'augmenter le domaine hydrophobe et d'apporter un niveau de stabilité bénéfique à la libération des acides nucléiques hors des endosomes cellulaires.

Comme les lipides soufrés sont difficilement solubles dans l'eau en raison de leur plus faible polarité, et que la présence de sels conduit à leur précipitation, nous avons testé les capacités des lipides à complexer l'ADN en présence de glucose afin d'obtenir une solution administrable par voie intraveineuse. Le lipophosphoramidate KLN47 a été utilisé comme contrôle en raison de sa forte efficacité de transfection, à la fois *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'en raison de résultats préliminaires encourageants après délivrance par les voies hautes. Cette seconde voie d'administration, permettant de cibler directement et localement l'épithélium pulmonaire, impose d'administrer un volume réduit de lipoplexes. Cela nécessite par conséquent l'utilisation de lipides cationiques pouvant complexer la totalité des acides nucléiques dès les faibles rapports de charges.

Dans un premier temps, suite à un criblage *in vitro* et des mesures de complexation avec chacun des lipothiophosphoramidates décrits dans le chapitre précédent^[539], nous avons sélectionné deux molécules à tester *in vivo* : le BSV44, présentant un bras espaceur à 3 carbones et une tête polaire ammonium, ainsi que le BSV14, possédant un espaceur à 2 carbones et une tête polaire phosphonium. Ces deux composés présentent de bonnes efficacités de transfection sur les différentes lignées de cellules épithéliales testées, accompagnées de toxicités modérées. De plus, ces deux molécules étaient celles capables de complexer l'ADN aux plus bas CRs, faisant d'elles de bonnes candidates pour les essais de

transfection par les voies hautes. Comme la complexation semblait augmentée en présence de glucose, nous avons choisi d'administrer (par voie intraveineuse) les lipoplexes avec deux concentrations de glucose (5 % et 25 %).

Nous avons tout d'abord pu observer que le BSV14 ne permet pas, dans les conditions testées, de transfection pulmonaire après administration intraveineuse, probablement en raison d'une instabilité des complexes trop importante. Le BSV44 en revanche, en combinaison avec le plasmide pGM144 codant la luciférase, permet une expression du transgène au niveau pulmonaire pendant plus de 20 jours lorsque les lipoplexes sont injectés en glucose. Ces résultats sont comparables, voire supérieurs (en termes de niveau d'expression dans les premiers jours suivant l'administration), à ceux obtenus avec le KLN47 dans les mêmes conditions. En revanche, si les complexes BSV44 en NaCl 0,9 % permettent également d'obtenir une forte expression pulmonaire du transgène le lendemain de l'administration, celle-ci diminue rapidement et disparaît en moins d'une semaine. L'agrégation des lipothiophosphoramidates en présence de sels n'empêche donc pas la transfection, mais semble diminuer la durée d'expression. Cette observation est curieuse car on pense généralement qu'une fois entré dans le noyau cellulaire, le plasmide a une cinétique d'expression qui lui est propre. On peut néanmoins émettre l'hypothèse que les lipoplexes « agrégés », en raison de leurs plus grandes tailles, sont piégés plus en amont dans la circulation pulmonaire, transfectant par la même occasion des populations cellulaires différentes (possédant un taux de renouvellement plus élevé).

Par ailleurs, la concentration en glucose (5 % ou 25 %) n'a pas d'influence perceptible sur les cinétiques d'expression du transgène, quelque soit le lipide testé (BSV44 ou KLN47). Aucune tendance ne peut également être dégagée quant à l'influence des structures lipidiques ou du diluant utilisé sur l'hépatotoxicité transitoire induite par les différents types de lipoplexes.

Ces premiers résultats obtenus par voie intraveineuse sont donc encourageants car ils témoignent de la capacité des lipides soufrés à transfecter le tissu pulmonaire. Il serait maintenant intéressant de connaître l'identité des cellules transfectées avec de tels composés. Il semble néanmoins très probable que, comme les cinétiques sont relativement similaires à celles obtenues avec le KLN47, les mêmes populations cellulaires soient transfectées (à savoir les pneumocytes).

Suite à ces résultats positifs obtenus par injection en intraveineuse, nous nous sommes concentrés à l'administration locale de lipoplexes, par les voies hautes. Un volume d'environ 60 μ L de lipoplexes stabilisés avec le MPEG2000-DSPE a ainsi été administré aux animaux anesthésiés à l'aide d'une canule. Peu de souris ont été traitées avec le BSV44 stabilisé. Cependant, toutes celles ayant reçues les lipoplexes présentèrent un signal positif par bioluminescence au niveau de la trachée, pendant plus de 13 jours. Ces données nous permettent de penser que l'administration de lipoplexes BSV44/pGM144 par les voies hautes est possible et n'entraîne pas d'effets toxiques aigus (toutes les souris étaient vivantes le lendemain de l'administration et ne présentaient pas de phénotype particulier). Si aucun signal n'a été localisé au niveau pulmonaire, c'est sans doute en raison d'un niveau d'expression trop faible pour être détecté par bioluminescence, plus que d'une absence totale de transfection. Il faudrait néanmoins confirmer cela par marquage immunohistochimique. Si aucune mesure de taille des particules soufrées stabilisées n'a été faite, les liposomes obtenus par injection éthanolique présentaient déjà une taille relativement grande (400 nm) ce qui pourrait aussi expliquer une certaine difficulté d'accès aux zones pulmonaires profondes. Par comparaison, les complexes stabilisés à base de KLN47 présentent une taille moyenne légèrement inférieure à 150 nm et permettent une expression pulmonaire importante au niveau des deux lobes pulmonaires dès les premiers jours suivant l'instillation. L'expression du transgène est alors beaucoup plus longue que celle obtenue après administration intraveineuse, puisque le signal peut alors durer plus de 100 jours (contre 45 au maximum après administration IV). Les analyses histologiques montrent que la luciférase est produite par les cellules épithéliales bronchiques, et non les macrophages. Néanmoins, le nombre de cellules transfectées n'est pas homogène au sein de l'épithélium et le protocole utilisé est également responsable d'une inflammation au niveau du parenchyme pulmonaire. Il paraît par conséquent nécessaire d'optimiser la technique d'administration afin d'être moins invasif et de limiter le risque de perte des complexes dans l'œsophage, tout en ayant accès aux zones profondes des voies respiratoires. Néanmoins, ces résultats représentent une réelle preuve de principe de la capacité des composés développés au laboratoire à transférer des gènes dans l'épithélium respiratoire après administration locale.

Il faut mentionner que ces travaux de délivrance par les voies hautes m'ont poussé à utiliser différents lipides cationiques et stabilisateurs, à tester différentes concentrations, CRs, plasmides rapporteurs *luc*, à effectuer plusieurs administrations successives, ... Les résultats

ont par exemple montré que le BSV4 (équivalent di-insaturé du KLN47) n'était pas supporté par les souris par cette voie d'administration, même à faibles doses. L'utilisation du plasmide pTG11033 dans les mêmes conditions que le pGM144 ne conduisait à aucun signal de bioluminescence, montrant ainsi la nécessité d'utiliser les outils les plus sensibles possibles afin de ne pas passer à côté de faux-négatifs. L'administration d'une masse supérieure à 50 µg d'ADNp par souris, ou contenant moins de stabilisateur, ne conduisait pas à augmenter le signal au niveau des poumons, de même que l'administration de lipoplexes à des CRs supérieurs à 2 ou que des administrations quotidiennes (ou tous les deux jours) avec des doses plus faibles.

De nombreuses variations au niveau de la composition des lipoplexes peuvent encore être apportées afin d'améliorer leur efficacité de transfection. Ces composés nécessitent également d'être évalués en utilisant un modèle animal plus approprié à la problématique de la mucoviscidose, de façon à travailler avec le gène d'intérêt (souris *cftr*^{-/-}), ou dans des conditions pulmonaires plus proches de celles observées dans la maladie (souris βENaC). Des essais préliminaires ont d'ores et déjà été effectués sur des souris *cftr*^{-/-} en utilisant la combinaison KLN47/MPEG2000-DSPE avec un plasmide codant CFTR. Cependant, aucune des souris traitées n'a toléré le traitement (même réduit) en raison de leur très petite taille et de leur extrême fragilité. Il est par conséquent nécessaire de poursuivre les essais en administrant non pas une solution, mais un brouillard que la souris puisse respirer normalement, afin de pouvoir juger de l'efficacité et la toxicité du lipide, en évitant l'atteinte liée au volume de lipide.

DISCUSSION, CONCLUSIONS et PERSPECTIVES GENERALES

Si dans son principe, la thérapie génique de la mucoviscidose est très attrayante, et bien qu'un certain nombre d'essais cliniques aient d'ores et déjà été réalisés^[173], il reste sans doute encore beaucoup de progrès à réaliser pour qu'elle ne devienne une réalité clinique efficace. Les approches actuelles consistent, en général, à transférer une version normale du gène *CFTR* dans l'épithélium respiratoire, ce qui constitue, comme nous l'avons vu, une thérapie génique somatique additive. Etant donné le renouvellement permanent des cellules cibles, la thérapie génique devra vraisemblablement être répétée dans le temps, à moins de parvenir à transfecter une proportion suffisante des cellules souches de l'épithélium des voies aériennes.

D'une manière générale, les virus sont les organismes les plus efficaces pour le transfert de gènes dans les cellules animales, et leur utilisation détournée a d'ores et déjà permis d'obtenir bon nombre de succès thérapeutiques concernant plusieurs types de maladies génétiques.

Concernant l'exemple précis de la mucoviscidose, les lentivirus recombinants sont particulièrement prometteurs car ils semblent relativement peu immunogènes et efficaces à long terme (même lors d'administrations successives), alors que les vecteurs adénoviraux et AAVs se sont heurtés à des problèmes inflammatoires et/ou de réponse immune lors des essais cliniques. Cependant, les vecteurs lentiviraux n'ont pas encore été évalués chez des patients atteints de mucoviscidose, et seuls les essais cliniques futurs pourront confirmer, ou infirmer, les espoirs placés en eux.

Les vecteurs non viraux, élaborés par synthèse chimique, constituent une alternative aux virus recombinants. En contrôlant précisément leur composition et leur formulation et en les adaptant au fur et à mesure aux contraintes extra et intracellulaires, on cherche à s'affranchir de la complexité, de la difficile reproductibilité, et du coût important des préparations virales obtenues à partir de cellules en culture. Les vecteurs synthétiques sont également attractifs en raison de risques infectieux et immunogènes moindres, ce qui est particulièrement important lorsque des administrations répétées du produit de thérapie génique sont nécessaires. L'essai clinique « multi-doses », lancé par le consortium britannique de thérapie génique de la mucoviscidose, devrait prochainement permettre d'évaluer leurs possibilités actuelles, car celui-ci utilise un plasmide *CFTR* fortement optimisé, couplé avec l'une des plus

efficaces formulations lipidiques parmi celles actuellement disponibles pour un usage clinique (GL67/DOPE/DMPE-PEG5000). Les essais cliniques antérieurs, menés avec des vecteurs synthétiques, ont montré qu'une correction partielle était possible, et que les effets secondaires se limitaient, dans certains cas, à un syndrome pseudo-grippal transitoire (peut-être lié à la présence de motifs CpGs non méthylés dans le plasmide utilisé). Cependant, il faut insister sur le fait que le développement de nouveaux vecteurs synthétiques plus efficaces et moins toxiques, en particulier de type « virus synthétiques », est un domaine de recherche très actif, dont les applications pourraient s'étendre à de nombreuses autres maladies, génétiques ou acquises ^[253]. Ces vecteurs sont en effet fonctionnalisés, de façon à franchir avec davantage d'efficacité les diverses étapes de leur parcours jusqu'aux noyaux des cellules cibles (Figure 71) ^[542].

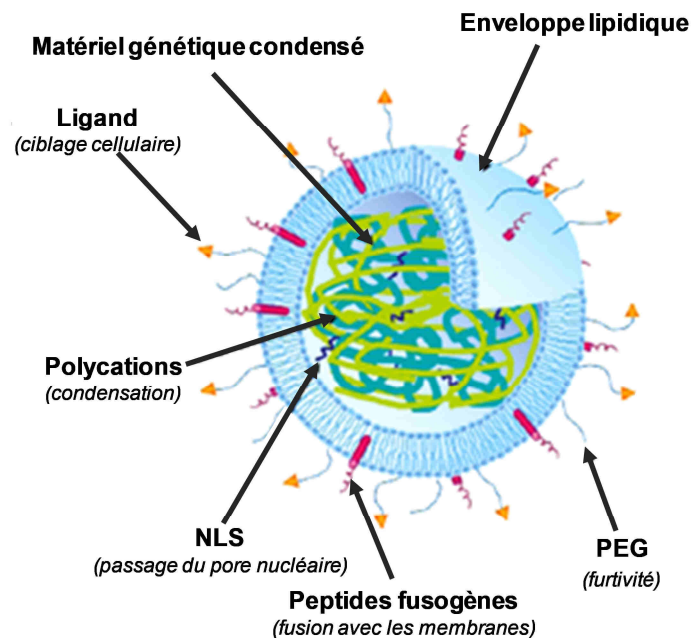


Figure 71 : Exemple de vecteur lipidique multifonctionnalisé (modifiée d'après ^[543])

Si de nombreuses familles de lipides cationiques ont été décrites au cours des vingt dernières années, notre groupe s'est employé à trouver des combinaisons structurales adéquates permettant d'augmenter l'efficacité de transfection sans engendrer de toxicité supplémentaire ^[325]. Il est pour cela nécessaire de bien comprendre, suivant leur voie d'administration, les barrières biologiques auxquelles doivent faire face les vecteurs synthétiques, afin de trouver des ajustements chimiques permettant de les surmonter au mieux.

L'étape limitante à laquelle nous nous sommes plus particulièrement intéressés au laboratoire est l'échappement endosomal des complexes, nécessaire à la libération des constructions nucléiques à proximité du noyau. Si plusieurs stratégies permettant de favoriser cette étape sont actuellement étudiées (ajout de peptides ou de colipides fusogènes, utilisation de liposomes acido-sensibles ou possédant un pouvoir tampon, ...), notre équipe s'intéresse plus particulièrement aux propriétés intrinsèques des liposomes à former des structures supramoléculaires connues pour favoriser ce processus.

Ainsi, au cours de ma thèse, nous avons pu mettre en évidence que le remplacement des chaînes aliphatiques oléiques et linoléiques (portées respectivement par les lipophosphoramidates KLN47 et BSV4) par des chaînes phytanyles, permettait la formation de structures fusogènes de type « phases hexagonales inverses ». Si le gain, en termes de fusogénicité, n'a pas été clairement démontré par des analyses physicochimiques, les résultats obtenus *in vitro* avec ce nouveau dérivé (BSV18) – efficacité de transfection plus importante, toxicité moindre - démontrent clairement l'effet bénéfique offert par ce type d'organisation structurale sur le devenir des lipoplexes, une fois en contact avec les membranes cellulaires. Celui-ci a également été confirmé *in vivo*, après administration systémique chez des souris normales. Les analyses histologiques montrent que les complexes sont capables de franchir l'endothélium vasculaire pulmonaire pour transférer les cellules épithéliales alvéolaires. Néanmoins, si les injections séparées des deux principales composantes des lipoplexes, à savoir les liposomes et l'ADN, ne produisent pas de réponse physiologique forte (uniquement une inflammation partielle le lendemain de l'injection des liposomes), la transfection s'accompagne aussi d'une réaction inflammatoire aiguë ainsi que d'une cytolysé hépatique transitoire, reflétant un mécanisme adaptatif de l'organisme. Lors de ces expériences préliminaires, la durée des atteintes physiologiques (2-3 jours) corrélait avec la durée d'expression pulmonaire du transgène (sous contrôle du promoteur « fort » CMV). Si aucun marqueur de l'immunité spécifique n'avait pu être mis en évidence dans nos expériences, et que des toxicités hépatiques aiguës et plus ou moins modérées avaient également été décrites par d'autres, nous nous interrogeons sur le lien qui pouvait exister entre le niveau d'expression du transgène et les phénomènes inflammatoires observés. Nous avons ainsi utilisé le plasmide pGM144, dont l'expression du gène rapporteur *luc* est contrôlée par le promoteur EF1 α , permettant des cinétiques d'expressions nettement prolongées par rapport au promoteur CMV (allant de quelques semaines à plusieurs mois). Dans les conditions testées, les réponses

observées – élévation des transaminases, inflammation partielle et transitoire – sont similaires, et ne semblent pas amplifiées suite à plusieurs administrations successives, ou par la présence de motifs immunostimulateurs CpGs.

La voie d'administration intraveineuse est logiquement incriminée concernant l'atteinte hépatique. En effet, il est admis qu'une grande partie des lipoplexes se retrouve alors rapidement capturée par les cellules phagocytaires du SPM (au niveau du foie et de la rate principalement) qui vont procéder à leur clairance. De plus, nous avons pu observer que le niveau des transaminases n'était pas augmenté après transfection par voie locale (intratrachéale). S'il est probable que l'inflammation provienne en grande partie de la nécrose hépatique, le franchissement de l'endothélium alvéolaire par les lipoplexes doit également participer au phénomène inflammatoire observé. Ceci pourrait justifier la difficulté à transférer le tissu pulmonaire lorsque les administrations sont trop rapprochées (période réfractaire). En effet, une fibrose cicatricielle locale pourrait survenir, et limiter le passage de matériel supplémentaire à travers l'endothélium. Ce phénomène pourrait par conséquent être étudié plus précisément, notamment en essayant traiter concomitamment l'inflammation. L'utilisation de dexaméthasone (hormone glucocorticoïde de synthèse) a d'ailleurs permis d'augmenter la durée d'expression du transgène, et de favoriser les efficacités de transfection obtenues après des administrations successives lors d'une étude cherchant à établir des relations entre les motifs CpGs, l'inflammation induite, et l'expression du transgène après administration(s) de lipoplexes chez la souris^[498]. Ce même anti-inflammatoire, complexé à l'intérieur de polyplexes (PEI/plasmide rapporteur *luc*) administrés par voie intratrachéale chez des souris modèles d'atteinte pulmonaire aiguë, a également permis d'augmenter la transfection des cellules épithéliales pulmonaires, tout en diminuant les marqueurs principaux de l'inflammation (TNF- α et IL-6)^[544].

Au-delà de chercher à vérifier les mécanismes moléculaires sous-jacents aux signes cliniques observés, ainsi que leurs conséquences précises, on peut se demander si les plasmides *luc* utilisés illustrent réellement la transfection que nous obtiendrions avec un plasmide d'intérêt. Afin de vérifier la capacité des lipophosphoramidates brestois à délivrer le gène d'intérêt *CFTR* dans un modèle murin plus adapté, le plasmide pCIK-CFTR a été couplé au lipophosphoramidate KLN47, et injecté par voie intraveineuse chez la souris *cftr*^{-/-}. De fortes concentrations d'ARNm *CFTR* sont retrouvées dans le tissu pulmonaire des souris traitées dès

le lendemain de l'administration (à une seule exception près ; [Figure 72](#)), témoignant de l'expression effective du transgène d'intérêt.

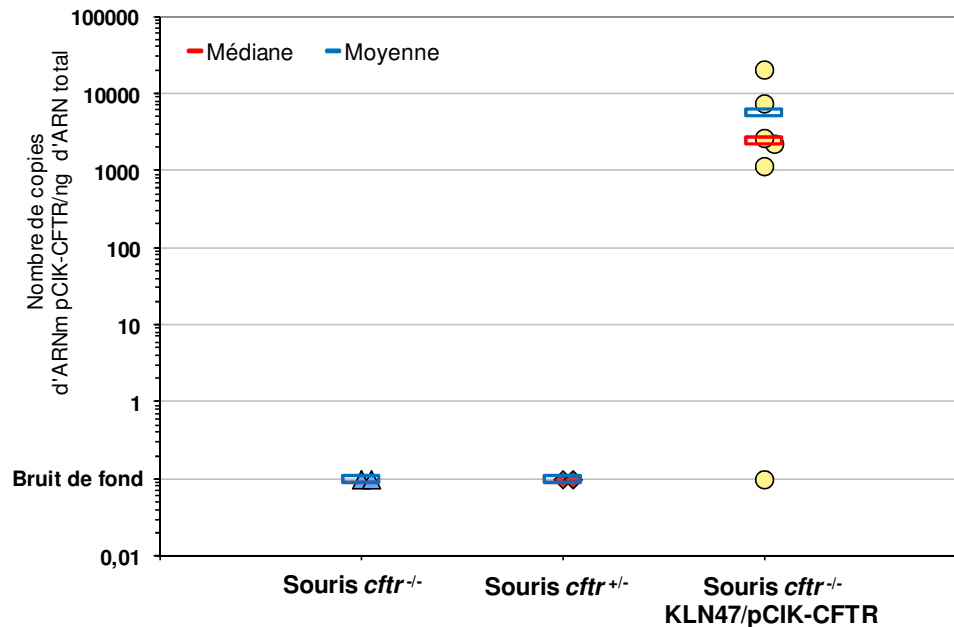


Figure 72 : Quantification des ARNm pCIK-CFTR dans les poumons de souris *cftr*^{-/-} ayant reçues une administration intraveineuse de lipoplexes KLN47/pCIK-CFTR. La quantité de lipoplexes administrée (au CR4, en NaCl 0,9 %) a été adaptée au poids des animaux de façon à délivrer 2 µg de plasmide complexé, par gramme de souris (50 µg dans 300 µL pour une souris de 25 g). Les poumons ont été prélevés 30 heures après la transfection, et les ARNm ont été quantifiés par RT-PCR quantitative en temps réel TaqMan. Taille des lipoplexes : 2 801±964 nm; ζ : 32 ± 4 mV.

Les analyses histologiques des tissus pulmonaires de souris traitées montrent que la protéine CFTR, à l'instar des résultats obtenus avec le plasmide *luc*, est principalement retrouvée au niveau des pneumocytes ([Figure 73](#)).

Les analyses hépatiques montrent, quant à elles, de très rares foyers de nécrose et d'inflammation ([Figure 74](#)).

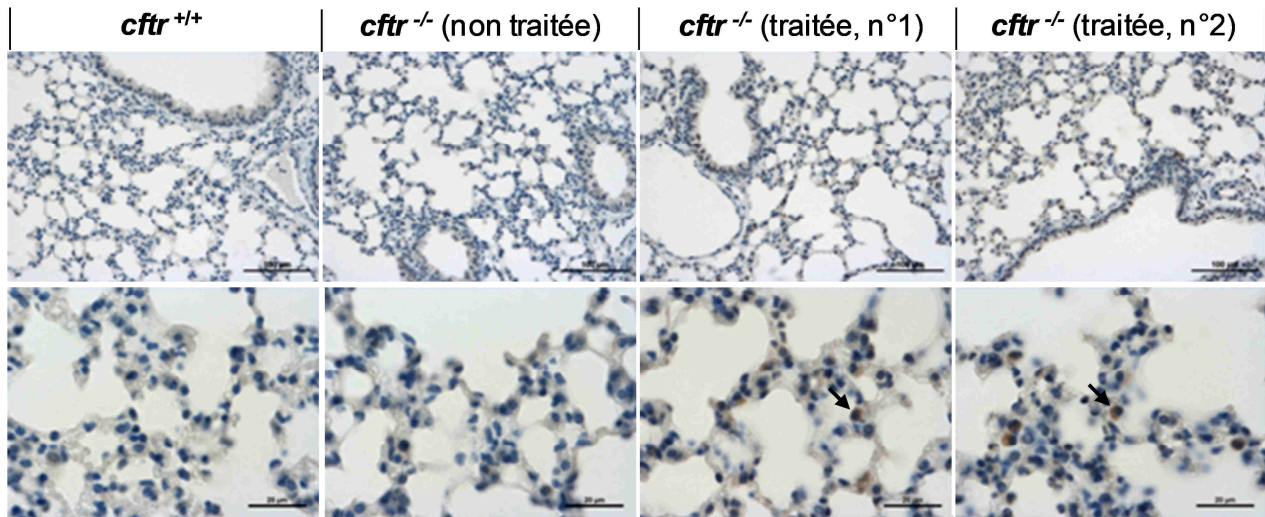


Figure 73 : Analyse anatomopathologique et marquage immunoenzymatique du CFTR humain sur un tissu pulmonaire sain et celui d'une souris *cftr*^{-/-} traitée avec KLN47/pCIK-CFTR (2 µg de plasmides complexés au CR4 par gramme de souris) ; observation par microscopie optique. Les flèches indiquent la détection de la protéine CFTR dans certains pneumocytes de type II. A noter que la protéine CFTR a également été retrouvée dans certains macrophages. La protéine CFTR murine n'est pas reconnue par l'anticorps dirigée contre le CFTR humain.

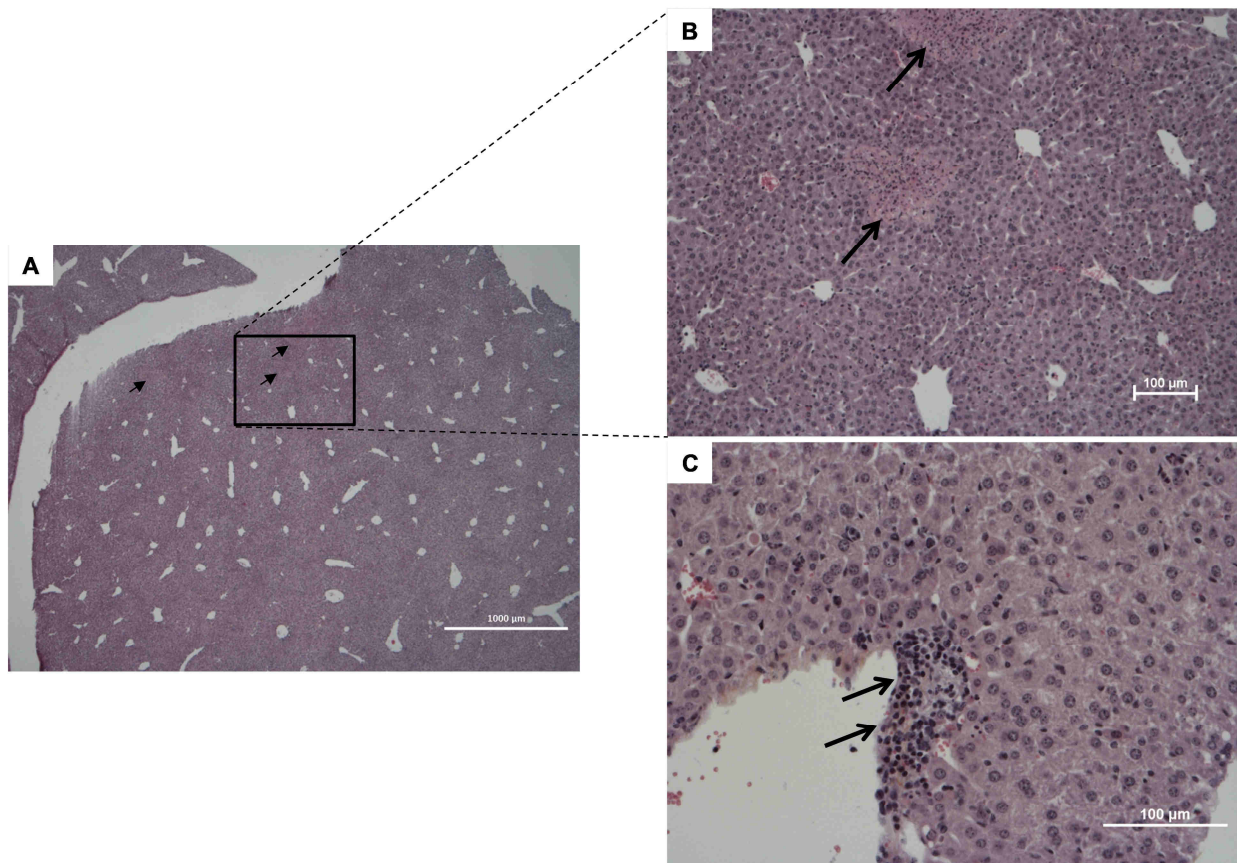


Figure 74 : Analyses anatomopathologiques de foies de souris *cftr*^{-/-} traitées avec KLN47/pCIK-CFTR (2 µg de plasmides complexés au CR4 par gramme de souris) ; observation par microscopie optique. Les flèches sur les images **A** et **B** indiquent la présence de petites zones de nécrose (de diamètres inférieurs à 200 µm), et celles sur l'image **C** indiquent une zone d'inflammation identifiée par la présence de lymphocytes et polynucléaires (Lecteurs : Alain Fautrel et Bruno Turlin).

Ces résultats confirment que nous disposons de vecteurs lipidiques permettant de transférer des gènes d'intérêt, tels que *CFTR*, dans les cellules épithéliales pulmonaires après administration intraveineuse. Malgré toutes les limites que le modèle animal utilisé comporte, ces données suggèrent, en raison des similarités au niveau de la biodistribution et de la microcirculation pulmonaire (diamètre des veines, distribution sanguine) existantes entre l'Homme et la souris, qu'il serait sans doute possible de transférer un gène d'intérêt dans certains pneumocytes alvéolaires humains, en utilisant les lipophosphoramidates par voie intraveineuse.

Cependant, la transfection pulmonaire provient d'un ciblage passif, les complexes injectés restant en effet séquestrés au niveau des capillaires alvéolaires en raison de leurs tailles importantes. Afin d'utiliser à bon escient le bénéfice des propriétés structurales mises en évidence dans ce manuscrit, il faudrait pouvoir obtenir des particules plus stables, de façon à abolir le risque d'embolie pulmonaire. Par conséquent, l'utilisation de motifs PEG, associés à des motifs de ciblages, apparaît indispensable. On peut également imaginer envelopper les complexes cationiques avec des lipides anioniques, justement développés pour leur plus grande stabilité en présence de protéines sériques^[545].

Néanmoins, l'approche de thérapie génique par voie intraveineuse n'est pas l'approche la plus adaptée à la mucoviscidose. La principale raison n'est pas liée à la toxicité engendrée ou aux risques d'infections provoquées par l'effraction de l'endothélium, mais aux populations cellulaires que l'on cible. En effet, il est difficilement envisageable d'atteindre massivement les cellules épithéliales des voies conductrices par administration systémique, en raison de leur difficile et aléatoire accessibilité. Or, les chercheurs s'accordent à dire que si toutes les cellules épithéliales pulmonaires doivent en principe être corrigées afin de rétablir un phénotype normal, la correction de celles des voies conductrices serait davantage bénéfique pour les patients^[131]. Par conséquent, l'approche de délivrance locale (par les voies aériennes), semble bien plus adaptée, mais présente des contraintes qui lui sont propres (volume administrable, maintien de l'intégrité de la fonction respiratoire, ...).

De premiers résultats significatifs ont pu être obtenus à l'aide lipoplexes stabilisés, à base de KLN47, permettant une expression du transgène quantifiable par bioluminescence pendant plus de 100 jours. Ces résultats ont mis en évidence l'importance d'utiliser des constructions nucléiques performantes pour évaluer l'efficacité de transfection des vecteurs synthétiques. Si

ce résultat constitue, en soi, une preuve de principe de la capacité des vecteurs à entrer dans les cellules épithéliales pulmonaires par le pôle apical, la méthode de dépôt intratrachéal n'est pas optimale (risques de noyade, variabilités importantes liées aux conditions d'administration) et pousse vers l'utilisation d'un nébuliseur permettant d'accéder, de façon moins invasive, à la majorité des territoires pulmonaires. Ainsi, l'étape suivante va consister à tester différentes formulations lipidiques sélectionnées, par aérosol chez la souris. La cage d'aérosolisation, calquée sur celle développée par l'équipe d'Oxford (*Nuffield Division of Clinical Laboratory Sciences ; Gene Medicine Research Group*), et qui utilise le nébuliseur PARI LC PLUS®, est sur le point d'être opérationnelle. Il existe cependant différents appareillages qui peuvent faire varier l'intégrité fonctionnelle des complexes nébulisés, et le nébuliseur AeroEclipse II BAN® pourrait du reste être davantage adapté à notre problématique^[546]. En effet, il n'est pas certain que les lipoplexes gardent leur activité transfectionnelle suite aux forces de cisaillement s'appliquant aux gouttelettes, lors de l'étape de nébulisation. Si certaines formulations lipidiques, comme le GL67, maintiennent leur activité lors de la formation du brouillard, ainsi qu'en présence de mucus CF^[547], la plupart d'entre elles voient une nette diminution, voire une abolition, de leur capacité de transfection^[548]. Par exemple, lors d'un premier essai, le KLN47 formulé avec ou sans colipide (Tetraether-diNH₂^[549]), combiné avec le plasmide *CFTR* utilisé dans l'essai clinique britannique (pGM169^[502]), s'est montré inefficace après administration par aérosol chez la souris. Cela souligne la nécessité de commencer par vérifier certains pré-requis nécessaires à une utilisation clinique des diverses formulations. De plus, l'utilisation de la cage d'aérosolisation va nécessiter beaucoup de matériel (vecteur et ADNp). Il serait donc judicieux de commencer par tester les complexes nébulisés sur des modèles cellulaires plus proches de l'épithélium bronchique que les lignées classiquement utilisées, tels que des cellules épithéliales primaires cultivées à l'interface air-liquide (Epithelix, Suisse), ou des cellules épithéliales primaires nasales.

Si le mucus CF (contenant des protéines, de l'ADN, des mucines et des phospholipides) constitue une barrière importante au transfert de gènes, celle-ci semble néanmoins être plus facilement franchissable par les vecteurs synthétiques que par les virus recombinants^[550]. Cependant, une étude montre que la pénétration des nanoparticules peut encore être améliorée en utilisant de la N-acétylcystéine (mucolytique) associée à la rhDNase^[551]. Dans cette étude, l'hypersécrétion de mucus (au niveau pulmonaire) obtenue après administration intratrachéale de lipopolysaccharide bactérien (*Pseudomonas aeruginosa*) chez la souris, peut

également être une technique pleine d'intérêt concernant le modèle murin que nous pourrions utiliser dans le futur. Les souris ENaC présentent également un phénotype pulmonaire particulièrement intéressant pour la recherche d'agents de transfert de gènes capables de franchir la barrière du mucus. Il n'en reste pas moins que les modèles d'animaux CF les plus représentatifs de la maladie (au niveau pulmonaire) sont le furet^[552] et le cochon^[553]. Leur utilisation permet par ailleurs d'apporter certains éléments de compréhension de la physiopathologie CF, notamment en ce qui concerne l'inflammation et l'infection bactérienne, ainsi que de tester certaines approches thérapeutiques. Néanmoins, l'accessibilité de ces modèles pour le transfert de gènes reste pour le moment très limitée. Il serait tout de même particulièrement intéressant de travailler sur un modèle animal possédant une infection pulmonaire, depuis que des résultats préliminaires obtenus au laboratoire, montrent que les lipophosphoramidates possèdent un double rôle « bactéricide – transfection », plus ou moins fort en fonction leur composition chimique^a.

Enfin, des technologies en développement ouvrent de nouvelles perspectives. Les approches de réparation génique à l'aide de nucléases de plus en plus efficaces et spécifiques, permettent d'envisager la correction des mutations au niveau du génome cellulaire même, donc une véritable chirurgie génétique. L'utilisation d'ARNi pourrait permettre de cibler diverses voies de l'inflammation, ou encore de contrôler l'expression du canal ENaC afin de réhydrater le mucus^[554]. Les progrès de la thérapie génique *ex vivo* permettent également d'envisager le repeuplement de l'épithélium respiratoire avec des cellules souches corrigées^[131]. Toutes ces approches transversales permettent d'envisager des associations inédites qui permettront sans doute de traiter un jour la maladie.

^a Le Gall et *al.*, en préparation

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Avery, O. T., Macleod, C. M. & McCarty, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* **79**, 137–158 (1944).
2. Watson, J. D. & Crick, F. H. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
3. Lederberg, J. Molecular biology, eugenics and euphenics. *Nature* **198**, 428–429 (1963).
4. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001).
5. Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougereuse, F., Leturcq, F., Kaplan, J.-C., Garcia, L. & Danos, O. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* **306**, 1796–1799 (2004).
6. Meister, G. & Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343–349 (2004).
7. Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A. & Ruddle, F. H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 7380–7384 (1980).
8. Costantini, F. & Lacy, E. Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. *Nature* **294**, 92–94 (1981).
9. Kahn, A. *Thérapie génique: l'ADN médicament*. (John Libbey Eurotext: 1993).
10. Jackson, D. A., Symons, R. H. & Berg, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 2904–2909 (1972).
11. Hammer, R. E., Palmiter, R. D. & Brinster, R. L. Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new gene. *Nature* **311**, 65–67 (1984).
12. Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., Karson, E. M., Lotze, M. T., Yang, J. C. & Topalian, S. L. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.* **323**, 570–578 (1990).
13. Culver, K. W., Anderson, W. F. & Blaese, R. M. Lymphocyte gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **2**, 107–109 (1991).
14. Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G., Wilson, J. M. & Batshaw, M. L. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* **80**, 148–158 (2003).
15. Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J.-L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M. & Fischer, A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **348**, 255–256 (2003).
16. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., LeBoulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415–419 (2003).
17. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L. & Fischer, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669–672 (2000).
18. Gaspar, H. B., Parsley, K. L., Howe, S., King, D., Gilmour, K. C., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt, M., Von Kalle, C., Barington, T., Jakobsen, M. A., Christensen, H. O., Al Ghonaium, A., White, H. N., Smith, J. L., Levinsky, R. J., Ali, R. R., Kinnon, C. & Thrasher, A. J. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* **364**, 2181–2187 (2004).
19. Ginn, S. L., Curtin, J. A., Kramer, B., Smyth, C. M., Wong, M., Kakakios, A., McCowage, G. B., Watson, D., Alexander, S. I., Latham, M., Cunningham, S. C., Zheng, M., Hobson, L., Rowe, P. B., Fischer, A.,

- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey-Abina, S. & Alexander, I. E. Treatment of an infant with X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1) by gene therapy in Australia. *Med. J. Aust.* **182**, 458–463 (2005).
20. Gänsbacher, B. Policy statement on the social, ethical and public awareness issues in gene therapy. *J Gene Med* **4**, 687–691 (2002).
 21. Gansbacher, B. Report of a second serious adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). Position of the European Society of Gene Therapy (ESGT). *J Gene Med* **5**, 261–262 (2003).
 22. *Report from the ASGT Ad Hoc Committee on Retroviral-mediated Gene Transfer to Hematopoietic Stem Cells.* (2003).at <http://www.asgct.org/position_statements/report_042003/>
 23. Hacein-Bey-Abina, S., Hauer, J., Lim, A., Picard, C., Wang, G. P., Berry, C. C., Martinache, C., Rieux-Laucat, F., Latour, S., Belohradsky, B. H., Leiva, L., Sorensen, R., Debré, M., Casanova, J. L., Blanche, S., Durandy, A., Bushman, F. D., Fischer, A. & Cavazzana-Calvo, M. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **363**, 355–364 (2010).
 24. Kohn, D. B. & Candotti, F. Gene therapy fulfilling its promise. *N. Engl. J. Med.* **360**, 518–521 (2009).
 25. Pawliuk, R., Westerman, K. A., Fabry, M. E., Payen, E., Tighe, R., Bouhassira, E. E., Acharya, S. A., Ellis, J., London, I. M., Eaves, C. J., Humphries, R. K., Beuzard, Y., Nagel, R. L. & Leboulch, P. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* **294**, 2368–2371 (2001).
 26. Recillas-Targa, F., Pikaart, M. J., Burgess-Beusse, B., Bell, A. C., Litt, M. D., West, A. G., Gaszner, M. & Felsenfeld, G. Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6883–6888 (2002).
 27. Tiberghien, P., Ferrand, C., Lioure, B., Milpied, N., Angonin, R., Deconinck, E., Certoux, J. M., Robinet, E., Saas, P., Petracca, B., Juttner, C., Reynolds, C. W., Longo, D. L., Hervé, P. & Cahn, J. Y. Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* **97**, 63–72 (2001).
 28. Litvinova, E., Maury, S., Boyer, O., Bruel, S., Benard, L., Boisserie, G., Klatzmann, D. & Cohen, J. L. Graft-versus-leukemia effect after suicide-gene-mediated control of graft-versus-host disease. *Blood* **100**, 2020–2025 (2002).
 29. Ott, M. G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kühlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., Naundorf, S., Brinkmann, A., Deichmann, A., Fischer, M., Ball, C., Pilz, I., Dunbar, C., Du, Y., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., *et al.* Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat. Med.* **12**, 401–409 (2006).
 30. One of three successfully treated CGD patients in a Swiss-German gene therapy trial died due to his underlying disease: A position statement from the European Society of Gene Therapy (ESGT). *J Gene Med* **8**, 1435 (2006).
 31. Morgan, R. A., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Yang, J. C., Sherry, R. M., Royal, R. E., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Restifo, N. P., Zheng, Z., Nahvi, A., de Vries, C. R., Rogers-Freezer, L. J., Mavroukakis, S. A. & Rosenberg, S. A. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* **314**, 126–129 (2006).
 32. Burns, W. R., Zheng, Z., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. Lack of specific gamma-retroviral vector long terminal repeat promoter silencing in patients receiving genetically engineered lymphocytes and activation upon lymphocyte restimulation. *Blood* **114**, 2888–2899 (2009).
 33. Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C. C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., Mahlaoui, N., Kiermer, V., Mittelstaedt, D., Bellesme, C., Lahlou, N., Lefrère, F., Blanche, S., Audit, M., Payen, E., Leboulch, P., *et al.* Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* **326**, 818–823 (2009).
 34. CARTIER, N. Thérapie génique de l'adréno-leucodystrophie. *Bull. Acad. Natle Méd* **194**, 255–268 (2010).
 35. Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K., Cavallesco, R., Gillet-Legrand, B., Caccavelli, L., Sgarra, R., Maouche-Chrétien, L., Bernaudin, F., Girot, R., Dorazio, R., Mulder, G.-J., Polack, A., *et al.* Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature* **467**, 318–322 (2010).
 36. Hughes, V. Therapy on trial. *Nat. Med.* **13**, 1008–1009 (2007).

37. Mingozi, F. & High, K. A. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 341–355 (2011).
38. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. & Danielsen, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7413–7417 (1987).
39. Caplen, N. J., Alton, E. W., Middleton, P. G., Dorin, J. R., Stevenson, B. J., Gao, X., Durham, S. R., Jeffery, P. K., Hodson, M. E. & Coutelle, C. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat. Med.* **1**, 39–46 (1995).
40. Fanconi, G., Uehlinger, E. & Knauer, C. Das coeliakies-syndrom bei zystischer pankreas-fibromatose und bronchiastasen. (1936).
41. Collins, F. S. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* **256**, 774–779 (1992).
42. Quinton, P. M. & Bijman, J. Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **308**, 1185–1189 (1983).
43. Knowles, M. R., Stutts, M. J., Spock, A., Fischer, N., Gatz, J. T. & Boucher, R. C. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* **221**, 1067–1070 (1983).
44. Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M. & Tsui, L. C. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073–1080 (1989).
45. Rommens, J. M., Zengerling-Lentes, S., Kerem, B., Melmer, G., Buchwald, M. & Tsui, L. C. Physical localization of two DNA markers closely linked to the cystic fibrosis locus by pulsed-field gel electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.* **45**, 932–941 (1989).
46. Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N. & Chou, J. L. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066–1073 (1989).
47. Munck, A. & Roussey, M. [The French nationwide cystic fibrosis newborn screening program: strategy and results]. *Arch Pediatr* **15 Suppl 1**, S1–6 (2008).
48. Férec, C., Audrezet, M. P., Mercier, B., Guillermit, H., Moullier, P., Quere, I. & Verlingue, C. Detection of over 98% cystic fibrosis mutations in a Celtic population. *Nat. Genet.* **1**, 188–191 (1992).
49. Ott, C. J., Blackledge, N. P., Kerschner, J. L., Leir, S.-H., Crawford, G. E., Cotton, C. U. & Harris, A. Intronic enhancers coordinate epithelial-specific looping of the active CFTR locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 19934–19939 (2009).
50. Romey, M.-C. [Functional characterization of naturally occurring CFTR mutants: interest for cystic fibrosis]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **64**, 429–437 (2006).
51. Rowe, S. M., Miller, S. & Sorscher, E. J. Cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1992–2001 (2005).
52. Cutting, G. R., Kasch, L. M., Rosenstein, B. J., Zielenski, J., Tsui, L. C., Antonarakis, S. E. & Kazazian, H. H., Jr A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein. *Nature* **346**, 366–369 (1990).
53. Haardt, M., Benharouga, M., Lechardeur, D., Kartner, N. & Lukacs, G. L. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J. Biol. Chem.* **274**, 21873–21877 (1999).
54. Férec, C., Scotet, V., Beucher, J. & Corvol, H. Génétique et gènes modificateurs, formes atypiques et rares. *Archives de Pédiatrie* **19**, **Supplement 1**, S3–S7 (2012).
55. Mendoza, J. L. & Thomas, P. J. Building an understanding of cystic fibrosis on the foundation of ABC transporter structures. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 499–505 (2007).
56. Dean, M. & Allikmets, R. Complete characterization of the human ABC gene family. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 475–479 (2001).
57. Riordan, J. R. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 609–630 (1993).
58. Akabas, M. H., Cheung, M. & Guinamard, R. Probing the structural and functional domains of the CFTR chloride channel. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 453–463 (1997).
59. Sheppard, D. N. & Welsh, M. J. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**, S23–45 (1999).
60. Akabas, M. H. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J. Biol. Chem.* **275**, 3729–3732 (2000).

61. Dawson, D. C., Smith, S. S. & Mansoura, M. K. CFTR: mechanism of anion conduction. *Physiol. Rev.* **79**, S47–75 (1999).
62. Smith, S. S., Liu, X., Zhang, Z. R., Sun, F., Kriewall, T. E., McCarty, N. A. & Dawson, D. C. CFTR: covalent and noncovalent modification suggests a role for fixed charges in anion conduction. *J. Gen. Physiol.* **118**, 407–431 (2001).
63. Linsdell, P. Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Exp. Physiol.* **91**, 123–129 (2006).
64. Yurko-Mauro, K. A. & Reenstra, W. W. Prostaglandin F₂α stimulates CFTR activity by PKA- and PKC-dependent phosphorylation. *Am. J. Physiol.* **275**, C653–660 (1998).
65. Pasyk, E. A., Morin, X. K., Zeman, P., Garami, E., Galley, K., Huan, L. J., Wang, Y. & Bear, C. E. A conserved region of the R domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is important in processing and function. *J. Biol. Chem.* **273**, 31759–31764 (1998).
66. Rich, D. P., Gregory, R. J., Cheng, S. H., Smith, A. E. & Welsh, M. J. Effect of deletion mutations on the function of CFTR chloride channels. *Recept. Channels* **1**, 221–232 (1993).
67. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. 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**, 945–951 (1982).
68. Clancy, J. P., Bebök, Z. & Sorscher, E. J. Purification, characterization, and expression of CFTR nucleotide-binding domains. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 475–482 (1997).
69. Berger, A. L., Ikuma, M. & Welsh, M. J. 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**, 455–460 (2005).
70. Seibert, F. S., Jia, Y., Mathews, C. J., Hanrahan, J. W., Riordan, J. R., Loo, T. W. & Clarke, D. M. Disease-associated mutations in cytoplasmic loops 1 and 2 of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impede processing or opening of the channel. *Biochemistry* **36**, 11966–11974 (1997).
71. Callebaut, I., Eudes, R., Mornon, J.-P. & Lehn, P. Nucleotide-binding domains of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: detailed sequence analysis and three-dimensional modeling of the heterodimer. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 230–242 (2004).
72. Lewis, H. A., Buchanan, S. G., Burley, S. K., Connors, K., Dickey, M., Dorwart, M., Fowler, R., Gao, X., Guggino, W. B., Hendrickson, W. A., Hunt, J. F., Kearins, M. C., Lorimer, D., Maloney, P. C., Post, K. W., Rajashankar, K. R., Rutter, M. E., Sauder, J. M., Shriver, S., Thibodeau, P. H., *et al.* Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J.* **23**, 282–293 (2004).
73. Mornon, J.-P., Lehn, P. & Callebaut, I. Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: membrane-spanning domains and coupling interfaces. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2594–2612 (2008).
74. Serohijos, A. W. R., Hegedus, T., Aleksandrov, A. A., He, L., Cui, L., Dokholyan, N. V. & Riordan, J. R. 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**, 3256–3261 (2008).
75. Mornon, J.-P., Lehn, P. & Callebaut, I. Molecular models of the open and closed states of the whole human CFTR protein. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3469–3486 (2009).
76. Montier, T., Dufour, F., Ravilly, S., Delpech, M. & Lehn, P. Mucoviscidose: progrès et espoirs. *Biofutur* 56–61
77. Gadsby, D. C., Vergani, P. & Csanády, L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **440**, 477–483 (2006).
78. Aleksandrov, L., Aleksandrov, A. A., Chang, X.-B. & Riordan, J. R. The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover. *J. Biol. Chem.* **277**, 15419–15425 (2002).
79. Basso, C., Vergani, P., Nairn, A. C. & Gadsby, D. C. Prolonged nonhydrolytic interaction of nucleotide with CFTR's NH₂-terminal nucleotide binding domain and its role in channel gating. *J. Gen. Physiol.* **122**, 333–348 (2003).
80. Egan, M. E., Schwiebert, E. M. & Guggino, W. B. Differential expression of ORCC and CFTR induced by low temperature in CF airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **268**, C243–251 (1995).

81. Schwiebert, E. M., Benos, D. J., Egan, M. E., Stutts, M. J. & Guggino, W. B. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**, S145–166 (1999).
82. Chambers, L. A., Rollins, B. M. & Tarran, R. Liquid movement across the surface epithelium of large airways. *Respir Physiol Neurobiol* **159**, 256–270 (2007).
83. Anderson, M. P., Gregory, R. J., Thompson, S., Souza, D. W., Paul, S., Mulligan, R. C., Smith, A. E. & Welsh, M. J. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* **253**, 202–205 (1991).
84. Linsdell, P., Tabcharani, J. A., Rommens, J. M., Hou, Y. X., Chang, X. B., Tsui, L. C., Riordan, J. R. & Hanrahan, J. W. Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions. *J. Gen. Physiol.* **110**, 355–364 (1997).
85. Linsdell, P. & Hanrahan, J. W. Glutathione permeability of CFTR. *Am. J. Physiol.* **275**, C323–326 (1998).
86. Reisin, I. L., Prat, A. G., Abraham, E. H., Amara, J. F., Gregory, R. J., Ausiello, D. A. & Cantiello, H. F. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J. Biol. Chem.* **269**, 20584–20591 (1994).
87. Welsh, M. J. & Smith, A. E. Cystic fibrosis. *Sci. Am.* **273**, 52–59 (1995).
88. Döring, G. Mechanisms of airway inflammation in cystic fibrosis. *Pediatr Allergy Immunol* **7**, 63–66 (1996).
89. Ratjen, F. & Döring, G. Cystic fibrosis. *Lancet* **361**, 681–689 (2003).
90. Davis, P. B., Drumm, M. & Konstan, M. W. Cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 1229–1256 (1996).
91. Oppenheimer, E. A., Case, A. L., Esterly, J. R. & Rothberg, R. M. Cervical mucus in cystic fibrosis: a possible cause of infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **108**, 673–674 (1970).
92. Gibson, L. E. & Cooke, R. E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* **23**, 545–549 (1959).
93. Pitt, J. J. Newborn screening. *Clin Biochem Rev* **31**, 57–68 (2010).
94. *GeneReviews*TM. (University of Washington, Seattle: Seattle (WA), 1993).at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301428>>
95. Pillarisetti, N., Williamson, E., Linnane, B., Skoric, B., Robertson, C. F., Robinson, P., Massie, J., Hall, G. L., Sly, P., Stick, S. & Ranganathan, S. Infection, inflammation, and lung function decline in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 75–81 (2011).
96. Pezzulo, A. A., Tang, X. X., Hoegger, M. J., Alaiwa, M. H. A., Ramachandran, S., Moninger, T. O., Karp, P. H., Wohlford-Lenane, C. L., Haagsman, H. P., van Eijk, M., Bánfi, B., Horswill, A. R., Stoltz, D. A., McCray, P. B., Jr, Welsh, M. J. & Zabner, J. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* **487**, 109–113 (2012).
97. Banner, K. H., De Jonge, H., Elborn, S., Growcott, E., Gulbins, E., Konstan, M., Moss, R., Poll, C., Randell, S. H., Rossi, A. G., Thomas, L. & Waltz, D. Highlights of a workshop to discuss targeting inflammation in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **8**, 1–8 (2009).
98. Kreindler, J. L. Cystic fibrosis: exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies. *Pharmacol. Ther.* **125**, 219–229 (2010).
99. Welch, E. M., Barton, E. R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W. J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C. R., Hwang, S., Wilde, R. G., Karp, G., Takasugi, J., Chen, G., Jones, S., Ren, H., Moon, Y.-C., Corson, D., Turpoff, A. A., Campbell, J. A., *et al.* PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* **447**, 87–91 (2007).
100. Finkel, R. S. Read-through strategies for suppression of nonsense mutations in Duchenne/ Becker muscular dystrophy: aminoglycosides and ataluren (PTC124). *J. Child Neurol.* **25**, 1158–1164 (2010).
101. Norez, C., Noel, S., Wilke, M., Bijvelds, M., Jorna, H., Melin, P., DeJonge, H. & Becq, F. Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett.* **580**, 2081–2086 (2006).
102. Norez, C., Antigny, F., Noel, S., Vandebrouck, C. & Becq, F. A cystic fibrosis respiratory epithelial cell chronically treated by miglustat acquires a non-cystic fibrosis-like phenotype. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **41**, 217–225 (2009).
103. Clancy, J. P., Rowe, S. M., Accurso, F. J., Aitken, M. L., Amin, R. S., Ashlock, M. A., Ballmann, M., Boyle, M. P., Bronsveld, I., Campbell, P. W., De Boeck, K., Donaldson, S. H., Dorkin, H. L., Dunitz, J. M., Durie, P. R.,

- Jain, M., Leonard, A., McCoy, K. S., Moss, R. B., Pilewski, J. M., *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**, 12–18 (2012).
104. Accurso, F. J., Rowe, S. M., Clancy, J. P., Boyle, M. P., Dunitz, J. M., Durie, P. R., Sagel, S. D., Hornick, D. B., Konstan, M. W., Donaldson, S. H., Moss, R. B., Pilewski, J. M., Rubenstein, R. C., Uluer, A. Z., Aitken, M. L., Freedman, S. D., Rose, L. M., Mayer-Hamblett, N., Dong, Q., Zha, J., *et al.* Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1991–2003 (2010).
105. Ramsey, B. W., Davies, J., McElvaney, N. G., Tullis, E., Bell, S. C., Dřevínek, P., Griese, M., McKone, E. F., Wainwright, C. E., Konstan, M. W., Moss, R., Ratjen, F., Sermet-Gaudelus, I., Rowe, S. M., Dong, Q., Rodriguez, S., Yen, K., Ordoñez, C. & Elborn, J. S. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1663–1672 (2011).
106. Kaiser, J. New Cystic Fibrosis Drug Offers Hope, at a Price. *Science* **335**, 645–645 (2012).
107. Deterding, R. R., Lavange, L. M., Engels, J. M., Mathews, D. W., Coquillet, S. J., Brody, A. S., Millard, S. P. & Ramsey, B. W. Phase 2 randomized safety and efficacy trial of nebulized denufosal tetrasodium in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 362–369 (2007).
108. Accurso, F. J., Moss, R. B., Wilmott, R. W., Anbar, R. D., Schaberg, A. E., Durham, T. A. & Ramsey, B. W. Denufosal tetrasodium in patients with cystic fibrosis and normal to mildly impaired lung function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 627–634 (2011).
109. Ratjen, F., Durham, T., Navratil, T., Schaberg, A., Accurso, F. J., Wainwright, C., Barnes, M. & Moss, R. B. Long term effects of denufosal tetrasodium in patients with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society* (2012).doi:10.1016/j.jcf.2012.05.003
110. Grasemann, H., Stehling, F., Brunar, H., Widmann, R., Laliberte, T. W., Molina, L., Döring, G. & Ratjen, F. Inhalation of Moli1901 in patients with cystic fibrosis. *Chest* **131**, 1461–1466 (2007).
111. Jones, A. M. & Helm, J. M. Emerging treatments in cystic fibrosis. *Drugs* **69**, 1903–1910 (2009).
112. Weibel, E. R. *Morphometry of the human lung*. (Academic Press: 1963).
113. Altieri, R. J. & Thompson, D. C. *Physiology and Pharmacology of the Airways*. In : Hickey A.J., *Inhalation aerosols. Physical and biological basis for therapy*,. (Informa Healthcare: New York, pp 83-126, 2007).at <<http://informahealthcare.com.gate2.inist.fr/doi/abs/10.3109/9781420019537.004>>
114. Evans, C. M. & Koo, J. S. Airway mucus: the good, the bad, the sticky. *Pharmacol. Ther.* **121**, 332–348 (2009).
115. Crosby, L. M. & Waters, C. M. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **298**, L715–731 (2010).
116. Reynolds, S. D. & Malkinson, A. M. Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1–4 (2010).
117. Johnson, M. D. Ion transport in alveolar type I cells. *Mol Biosyst* **3**, 178–186 (2007).
118. Notter, R. H. *Lung Surfactants: Basic Science and Clinical Applications*. (Taylor & Francis: 2000).
119. Chu, C. S., Trapnell, B. C., Curristin, S., Cutting, G. R. & Crystal, R. G. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat. Genet.* **3**, 151–156 (1993).
120. Engelhardt, J. F., Yankaskas, J. R., Ernst, S. A., Yang, Y., Marino, C. R., Boucher, R. C., Cohn, J. A. & Wilson, J. M. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat. Genet.* **2**, 240–248 (1992).
121. Engelhardt, J. F., Zepeda, M., Cohn, J. A., Yankaskas, J. R. & Wilson, J. M. Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J. Clin. Invest.* **93**, 737–749 (1994).
122. Pringle, I. A., Hyde, S. C. & Gill, D. R. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: recent developments and future prospects. *Expert Opin Biol Ther* **9**, 991–1003 (2009).
123. Dorin, J. R., Farley, R., Webb, S., Smith, S. N., Farini, E., Delaney, S. J., Wainwright, B. J., Alton, E. W. & Porteous, D. J. A demonstration using mouse models that successful gene therapy for cystic fibrosis requires only partial gene correction. *Gene Ther.* **3**, 797–801 (1996).
124. Johnson, L. G., Olsen, J. C., Sarkadi, B., Moore, K. L., Swanstrom, R. & Boucher, R. C. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat. Genet.* **2**, 21–25 (1992).
125. Farmen, S. L., Karp, P. H., Ng, P., Palmer, D. J., Koehler, D. R., Hu, J., Beaudet, A. L., Zabner, J. & Welsh, M. J. 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**, L1123–1130 (2005).
126. Johnson, L. G., Boyles, S. E., Wilson, J. & Boucher, R. C. Normalization of raised sodium absorption and raised calcium-mediated chloride secretion by adenovirus-mediated expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in primary human cystic fibrosis airway epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **95**, 1377–1382 (1995).
127. Goldman, M. J., Yang, Y. & Wilson, J. M. Gene therapy in a xenograft model of cystic fibrosis lung corrects chloride transport more effectively than the sodium defect. *Nat. Genet.* **9**, 126–131 (1995).
128. Mall, M., Grubb, B. R., Harkema, J. R., O’Neal, W. K. & Boucher, R. C. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat. Med.* **10**, 487–493 (2004).
129. Larson, J. E., Morrow, S. L., Happel, L., Sharp, J. F. & Cohen, J. C. Reversal of cystic fibrosis phenotype in mice by gene therapy in utero. *Lancet* **349**, 619–620 (1997).
130. Davies, L. A., Varathalingam, A., Painter, H., Lawton, A. E., Sumner-Jones, S. G., Nunez-Alonso, G. A., Chan, M., Munkonge, F., Alton, E. W. F. W., Hyde, S. C. & Gill, D. R. Adenovirus-mediated in utero expression of CFTR does not improve survival of CFTR knockout mice. *Mol. Ther.* **16**, 812–818 (2008).
131. Conese, M., Ascenzioni, F., Boyd, A. C., Coutelle, C., De Fino, I., De Smedt, S., Rejman, J., Rosenecker, J., Schindelhauer, D. & Scholte, B. J. Gene and cell therapy for cystic fibrosis: From bench to bedside. *Journal of Cystic Fibrosis* **10**, Supplement 2, S114–S128 (2011).
132. Luton, D., Oudrhiri, N., de Lagausie, P., Aissaoui, A., Hauchecorne, M., Julia, S., Oury, J.-F., Aigrain, Y., Peuchmaur, M., Vigneron, J.-P., Lehn, J.-M. & Lehn, P. Gene transfection into fetal sheep airways in utero using guanidinium-cholesterol cationic lipids. *J Gene Med* **6**, 328–336 (2004).
133. Peebles, D., Gregory, L. G., David, A., Themis, M., Waddington, S. N., Knapton, H. J., Miah, M., Cook, T., Lawrence, L., Nivsarkar, M., Rodeck, C. & Coutelle, C. Widespread and efficient marker gene expression in the airway epithelia of fetal sheep after minimally invasive tracheal application of recombinant adenovirus in utero. *Gene Ther.* **11**, 70–78 (2004).
134. Boyle, M. P., Enke, R. A., Adams, R. J., Guggino, W. B. & Zeitlin, P. L. In utero AAV-mediated gene transfer to rabbit pulmonary epithelium. *Mol. Ther.* **4**, 115–121 (2001).
135. Keswani, S. G., Balaji, S., Le, L., Leung, A., Katz, A. B., Lim, F.-Y., Habli, M., Jones, H. N., Wilson, J. M. & Crombleholme, T. M. 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**, e43633 (2012).
136. Kaji, E. H. & Leiden, J. M. Gene and stem cell therapies. *JAMA* **285**, 545–550 (2001).
137. Wong, A. P., Dutly, A. E., Sacher, A., Lee, H., Hwang, D. M., Liu, M., Keshavjee, S., Hu, J. & Waddell, T. K. Targeted cell replacement with bone marrow cells for airway epithelial regeneration. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **293**, L740–752 (2007).
138. Gupta, N., Su, X., Popov, B., Lee, J. W., Serikov, V. & Matthay, M. A. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J. Immunol.* **179**, 1855–1863 (2007).
139. Piro, D., Rejman, J. & Conese, M. Stem cell therapy for cystic fibrosis: current status and future prospects. *Expert Rev Respir Med* **2**, 365–380 (2008).
140. Rejman, J., Colombo, C. & Conese, M. Engraftment of bone marrow-derived stem cells to the lung in a model of acute respiratory infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Ther.* **17**, 1257–1265 (2009).
141. Leblond, A.-L., Naud, P., Forest, V., Gourden, C., Sagan, C., Romefort, B., Mathieu, E., Delorme, B., Collin, C., Pagès, J.-C., Sensebé, L., Pitard, B. & Lemarchand, P. 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**, 1329–1343 (2009).
142. Loi, R., Beckett, T., Goncz, K. K., Suratt, B. T. & Weiss, D. J. Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 171–179 (2006).
143. Bruscia, E. M., Price, J. E., Cheng, E.-C., Weiner, S., Caputo, C., Ferreira, E. C., Egan, M. E. & Krause, D. S. Assessment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity in CFTR-null mice after bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 2965–2970 (2006).

144. Bruscia, E. M., Ziegler, E. C., Price, J. E., Weiner, S., Egan, M. E. & Krause, D. S. Engraftment of donor-derived epithelial cells in multiple organs following bone marrow transplantation into newborn mice. *Stem Cells* **24**, 2299–2308 (2006).
145. Li, H., Haurigot, V., Doyon, Y., Li, T., Wong, S. Y., Bhagwat, A. S., Malani, N., Anguela, X. M., Sharma, R., Ivanciu, L., Murphy, S. L., Finn, J. D., Khazi, F. R., Zhou, S., Paschon, D. E., Rebar, E. J., Bushman, F. D., Gregory, P. D., Holmes, M. C. & High, K. A. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* **475**, 217–221 (2011).
146. Bedell, V. M., Wang, Y., Campbell, J. M., Poshusta, T. L., Starker, C. G., Krug li, R. G., Tan, W., Penheiter, S. G., Ma, A. C., Leung, A. Y. H., Fahrenkrug, S. C., Carlson, D. F., Voytas, D. F., Clark, K. J., Essner, J. J. & Ekker, S. C. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* (2012).doi:10.1038/nature11537
147. Pan, H., Zhang, W., Zhang, W. & Liu, G.-H. Find and replace: editing human genome in pluripotent stem cells. *Protein Cell* **2**, 950–956 (2011).
148. Liu, X., Jiang, Q., Mansfield, S. G., Puttaraju, M., Zhang, Y., Zhou, W., Cohn, J. A., Garcia-Blanco, M. A., Mitchell, L. G. & Engelhardt, J. F. Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat. Biotechnol.* **20**, 47–52 (2002).
149. Liu, X., Luo, M., Zhang, L. N., Yan, Z., Zak, R., Ding, W., Mansfield, S. G., Mitchell, L. G. & Engelhardt, J. F. 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**, 1116–1123 (2005).
150. Corcos, L. & Solier, S. Épissage alternatif, pathologie et thérapeutique moléculaire. *M/S: médecine sciences* **21**, (2005).
151. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
152. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
153. Takahashi, Y., Nishikawa, M. & Takakura, Y. Nonviral vector-mediated RNA interference: Its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 760–766 (2009).
154. Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H. J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., Yen, Y., Heidel, J. D. & Ribas, A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* **464**, 1067–1070 (2010).
155. Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N. & Nemunaitis, J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 746–759 (2009).
156. Gaudet, D., Méthot, J., Déry, S., Brisson, D., Essiembre, C., Tremblay, G., Tremblay, K., de Wal, J., Twisk, J., van den Bulk, N., Sier-Ferreira, V. & van Deventer, S. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene therapy* (2012).doi:10.1038/gt.2012.43
157. Lech, P. & Somia, N. V. Retrovirus vectors. *Contrib Nephrol* **159**, 30–46 (2008).
158. Sakuma, T., Barry, M. A. & Ikeda, Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* **443**, 603–618 (2012).
159. Wilson, J. M. Adeno-associated virus and lentivirus pseudotypes for lung-directed gene therapy. *Proc Am Thorac Soc* **1**, 309–314 (2004).
160. Copreni, E., Penzo, M., Carrabino, S. & Conese, M. Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium: a promising approach to gene therapy of cystic fibrosis. *Gene Ther.* **11 Suppl 1**, S67–75 (2004).
161. Stocker, A. G., Kremer, K. L., Koldej, R., Miller, D. S., Anson, D. S. & Parsons, D. W. Single-dose lentiviral gene transfer for lifetime airway gene expression. *J Gene Med* **11**, 861–867 (2009).
162. Limberis, M., Anson, D. S., Fuller, M. & Parsons, D. W. 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**, 1961–1970 (2002).
163. Ferrari, S., Griesenbach, U., Iida, A., Farley, R., Wright, A. M., Zhu, J., Munkonge, F. M., Smith, S. N., You, J., Ban, H., Inoue, M., Chan, M., Singh, C., Verdon, B., Argent, B. E., Wainwright, B., Jeffery, P. K., Geddes,

- D. M., Porteous, D. J., Hyde, S. C., *et al.* Sendai virus-mediated CFTR gene transfer to the airway epithelium. *Gene Ther* **14**, 1371–9 (2007).
164. Mitomo, K., Griesenbach, U., Inoue, M., Somerton, L., Meng, C., Akiba, E., Tabata, T., Ueda, Y., Frankel, G. M., Farley, R., Singh, C., Chan, M., Munkonge, F., Brum, A., Xenariou, S., Escudero-Garcia, S., Hasegawa, M. & Alton, E. W. Toward gene therapy for cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with Sendai virus envelopes. *Mol Ther* **18**, 1173–82 (2010).
165. Griesenbach, U., Inoue, M., Meng, C., Farley, R., Chan, M., Newman, N. K., Brum, A., You, J., Kerton, A., Shoemark, A., Boyd, A. C., Davies, J. C., Higgins, T. E., Gill, D. R., Hyde, S. C., Innes, J. A., Porteous, D. J., Hasegawa, M. & Alton, E. W. F. W. Assessment of F/HN-Pseudotyped Lentivirus as a Clinically Relevant Vector for Lung Gene Therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2012).doi:10.1164/rccm.201206-1056OC
166. Rawlins, E. L. & Hogan, B. L. M. Ciliated epithelial cell lifespan in the mouse trachea and lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **295**, L231–234 (2008).
167. Sinn, P. L., Arias, A. C., Brogden, K. A. & McCray, P. B., Jr Lentivirus vector can be readministered to nasal epithelia without blocking immune responses. *J. Virol.* **82**, 10684–10692 (2008).
168. Katkin, J. P., Gilbert, B. E., Langston, C., French, K. & Beaudet, A. L. Aerosol delivery of a beta-galactosidase adenoviral vector to the lungs of rodents. *Hum. Gene Ther.* **6**, 985–995 (1995).
169. Scaria, A., St George, J. A., Jiang, C., Kaplan, J. M., Wadsworth, S. C. & Gregory, R. J. Adenovirus-mediated persistent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in mouse airway epithelium. *J. Virol.* **72**, 7302–7309 (1998).
170. Harvey, B. G., Leopold, P. L., Hackett, N. R., Grasso, T. M., Williams, P. M., Tucker, A. L., Kaner, R. J., Ferris, B., Gonda, I., Sweeney, T. D., Ramalingam, R., Koveshi, I., Shak, S. & Crystal, R. G. Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *J. Clin. Invest.* **104**, 1245–1255 (1999).
171. Joseph, P. M., O’Sullivan, B. P., Lapey, A., Dorkin, H., Oren, J., Balfour, R., Perricone, M. A., Rosenberg, M., Wadsworth, S. C., Smith, A. E., St George, J. A. & Meeker, D. P. Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. I. Methods, safety, and clinical implications. *Hum. Gene Ther.* **12**, 1369–1382 (2001).
172. Walters, R. W., Grunst, T., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., Welsh, M. J. & Zabner, J. Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J. Biol. Chem.* **274**, 10219–10226 (1999).
173. Griesenbach, U. & Alton, E. W. Gene transfer to the lung: lessons learned from more than 2 decades of CF gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 128–39 (2009).
174. Hoggan, M. D., Blacklow, N. R. & Rowe, W. P. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **55**, 1467–1474 (1966).
175. Berns, K. I. Parvovirus replication. *Microbiol. Rev.* **54**, 316–329 (1990).
176. Daya, S. & Berns, K. I. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 583–593 (2008).
177. Lai, C. M., Lai, Y. K. Y. & Rakoczy, P. E. Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol.* **21**, 895–913 (2002).
178. Linden, R. M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E. & Berns, K. I. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 11288–11294 (1996).
179. Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M. & Berns, K. I. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 2211–2215 (1990).
180. Kotin, R. M., Linden, R. M. & Berns, K. I. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J.* **11**, 5071–5078 (1992).
181. Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N. & Hunter, L. A. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* **10**, 3941–3950 (1991).
182. McCarty, D. M., Young, S. M., Jr & Samulski, R. J. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 819–845 (2004).

183. Urcelay, E., Ward, P., Wiener, S. M., Safer, B. & Kotin, R. M. Asymmetric replication in vitro from a human sequence element is dependent on adeno-associated virus Rep protein. *J. Virol.* **69**, 2038–2046 (1995).
184. Weitzman, M. D., Kyöstiö, S. R., Kotin, R. M. & Owens, R. A. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5808–5812 (1994).
185. Moss, R. B., Milla, C., Colombo, J., Accurso, F., Zeitlin, P. L., Clancy, J. P., Spencer, L. T., Pilewski, J., Waltz, D. A., Dorkin, H. L., Ferkol, T., Pian, M., Ramsey, B., Carter, B. J., Martin, D. B. & Heald, A. E. Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum. Gene Ther.* **18**, 726–732 (2007).
186. Reich, S. J., Auricchio, A., Hildinger, M., Glover, E., Maguire, A. M., Wilson, J. M. & Bennett, J. Efficient trans-splicing in the retina expands the utility of adeno-associated virus as a vector for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **14**, 37–44 (2003).
187. Duan, D., Yue, Y. & Engelhardt, J. F. Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison. *Mol. Ther.* **4**, 383–391 (2001).
188. Yan, Z., Zhang, Y., Duan, D. & Engelhardt, J. F. Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6716–6721 (2000).
189. Nakai, H., Storm, T. A. & Kay, M. A. 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**, 9451–9463 (2000).
190. Song, Y., Lou, H. H., Boyer, J. L., Limberis, M. P., Vandenberghe, L. H., Hackett, N. R., Leopold, P. L., Wilson, J. M. & Crystal, R. G. Functional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in cystic fibrosis airway epithelial cells by AAV6.2-mediated segmental trans-splicing. *Hum. Gene Ther.* **20**, 267–281 (2009).
191. Lostal, W., Bartoli, M., Bourg, N., Roudaut, C., Bentaïb, A., Miyake, K., Guerchet, N., Fougerousse, F., McNeil, P. & Richard, I. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1897–1907 (2010).
192. van Deutekom, J. C., Bremmer-Bout, M., Janson, A. A., Ginjaar, I. B., Baas, F., den Dunnen, J. T. & van Ommen, G. J. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1547–1554 (2001).
193. van Deutekom, J. C., Janson, A. A., Ginjaar, I. B., Frankhuizen, W. S., Aartsma-Rus, A., Bremmer-Bout, M., den Dunnen, J. T., Koop, K., van der Kooij, A. J., Goemans, N. M., de Kimpe, S. J., Ekhardt, P. F., Venneker, E. H., Platenburg, G. J., Verschuuren, J. J. & van Ommen, G.-J. B. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2677–2686 (2007).
194. Matera, A. G., Terns, R. M. & Terns, M. P. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 209–220 (2007).
195. Bérout, C., Tuffery-Giraud, S., Matsuo, M., Hamroun, D., Humbertclaude, V., Monnier, N., Moizard, M.-P., Voelckel, M.-A., Calemard, L. M., Boisseau, P., Blayau, M., Philippe, C., Cossée, M., Pagès, M., Rivier, F., Danos, O., Garcia, L. & Clautres, M. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mutat.* **28**, 196–202 (2007).
196. Moore, M. J. & Flotte, T. R. Autoimmunity in a genetic disease—a cautionary tale. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1473–1475 (2010).
197. Burton, E. A., Fink, D. J. & Glorioso, J. C. Gene delivery using herpes simplex virus vectors. *DNA Cell Biol.* **21**, 915–936 (2002).
198. Griesenbach, U., McLachlan, G., Owaki, T., Somerton, L., Shu, T., Baker, A., Tennant, P., Gordon, C., Vrettou, C., Baker, E., Collie, D. D., Hasegawa, M. & Alton, E. W. Validation of recombinant Sendai virus in a non-natural host model. *Gene Ther.* **18**, 182–8 (2011).
199. Griesenbach, U., Inoue, M., Hasegawa, M. & Alton, E. W. F. W. Sendai virus for gene therapy and vaccination. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **7**, 346–352 (2005).
200. Niidome, T. & Huang, L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther.* **9**, 1647–1652 (2002).

201. Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. & Felgner, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**, 1465–1468 (1990).
202. Liu, F., Song, Y. & Liu, D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* **6**, 1258–1266 (1999).
203. Zhang, G., Budker, V. & Wolff, J. A. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* **10**, 1735–1737 (1999).
204. Maruyama, H., Higuchi, N., Nishikawa, Y., Kameda, S., Iino, N., Kazama, J. J., Takahashi, N., Sugawa, M., Hanawa, H., Tada, N., Miyazaki, J. & Gejyo, F. High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection. *J Gene Med* **4**, 333–341 (2002).
205. Zhang, X., Dong, X., Sawyer, G. J., Collins, L. & Fabre, J. W. Regional hydrodynamic gene delivery to the rat liver with physiological volumes of DNA solution. *J Gene Med* **6**, 693–703 (2004).
206. Hagstrom, J. E., Hegge, J., Zhang, G., Noble, M., Budker, V., Lewis, D. L., Herweijer, H. & Wolff, J. A. A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Mol. Ther.* **10**, 386–398 (2004).
207. Herweijer, H. & Wolff, J. A. Gene therapy progress and prospects: Hydrodynamic gene delivery. *Gene Therapy* **14**, 99–107 (2007).
208. Suda, T., Suda, K. & Liu, D. Computer-assisted hydrodynamic gene delivery. *Mol. Ther.* **16**, 1098–1104 (2008).
209. Klein, R. M., Wolf, E. D., Wu, R. & Sanford, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. *Biotechnology* **24**, 384–386 (1992).
210. Yang, N. S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B. & McCabe, D. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 9568–9572 (1990).
211. Williams, R. S., Johnston, S. A., Riedy, M., DeVit, M. J., McElligott, S. G. & Sanford, J. C. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 2726–2730 (1991).
212. Lee, P.-W., Peng, S.-F., Su, C.-J., Mi, F.-L., Chen, H.-L., Wei, M.-C., Lin, H.-J. & Sung, H.-W. The use of biodegradable polymeric nanoparticles in combination with a low-pressure gene gun for transdermal DNA delivery. *Biomaterials* **29**, 742–751 (2008).
213. Wang, S., Joshi, S. & Lu, S. Delivery of DNA to skin by particle bombardment. *Methods Mol. Biol.* **245**, 185–196 (2004).
214. Mitragotri, S. Current status and future prospects of needle-free liquid jet injectors. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 543–548 (2006).
215. Walther, W., Stein, U., Fichtner, I., Malcherek, L., Lemm, M. & Schlag, P. M. Nonviral in vivo gene delivery into tumors using a novel low volume jet-injection technology. *Gene Ther.* **8**, 173–180 (2001).
216. Walther, W., Stein, U., Fichtner, I., Kobelt, D., Aumann, J., Arlt, F. & Schlag, P. M. Nonviral jet-injection gene transfer for efficient in vivo cytosine deaminase suicide gene therapy of colon carcinoma. *Mol. Ther.* **12**, 1176–1184 (2005).
217. Imoto, J.-I. & Konishi, E. 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**, 205–212 (2005).
218. Imoto, J., Ishikawa, T., Yamanaka, A., Konishi, M., Murakami, K., Shibahara, T., Kubo, M., Lim, C.-K., Hamano, M., Takasaki, T., Kurane, I., Udagawa, H., Mukuta, Y. & Konishi, E. 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 mummification in pregnant sows. *Vaccine* **28**, 7373–7380 (2010).
219. Michinaka, Y. & Mitragotri, S. Delivery of polymeric particles into skin using needle-free liquid jet injectors. *J Control Release* **153**, 249–254 (2011).
220. Miller, D. L., Pislaru, S. V. & Greenleaf, J. E. Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation. *Somat. Cell Mol. Genet.* **27**, 115–134 (2002).
221. Yoon, C. S. & Park, J. H. Ultrasound-mediated gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **7**, 321–330 (2010).
222. Deshpande, M. C. & Prausnitz, M. R. Synergistic effect of ultrasound and PEI on DNA transfection in vitro. *J Control Release* **118**, 126–135 (2007).

223. Li, Y. S., Davidson, E., Reid, C. N. & McHale, A. P. 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**, 62–69 (2009).
224. Schratzberger, P., Krainin, J. G., Schratzberger, G., Silver, M., Ma, H., Kearney, M., Zuk, R. F., Brisken, A. F., Losordo, D. W. & Isner, J. M. Transcutaneous ultrasound augments naked DNA transfection of skeletal muscle. *Mol. Ther.* **6**, 576–583 (2002).
225. Lu, Q. L., Liang, H.-D., Partridge, T. & Blomley, M. J. K. Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. *Gene Ther.* **10**, 396–405 (2003).
226. Tsunoda, S., Mazda, O., Oda, Y., Iida, Y., Akabame, S., Kishida, T., Shin-Ya, M., Asada, H., Gojo, S., Imanishi, J., Matsubara, H. & Yoshikawa, T. Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**, 118–127 (2005).
227. Chen, S., Ding, J., Bekeredjian, R., Yang, B., Shohet, R. V., Johnston, S. A., Hohmeier, H. E., Newgard, C. B. & Grayburn, P. A. Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 8469–8474 (2006).
228. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. & Hofschneider, P. H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1**, 841–845 (1982).
229. Laurent, V., Fraix, A., Montier, T., Cammas-Marion, S., Ribault, C., Benvegna, T., Jaffres, P.-A. & Loyer, P. Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells: new means for drug metabolism and toxicity studies. *Biotechnol J* **5**, 314–320 (2010).
230. Heller, L. C. & Heller, R. Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma. *Curr Gene Ther* **10**, 312–317 (2010).
231. Chiarella, P., Fazio, V. M. & Signori, E. Application of electroporation in DNA vaccination protocols. *Curr Gene Ther* **10**, 281–286 (2010).
232. Pringle, I. A., McLachlan, G., Collie, D. D. S., Sumner-Jones, S. G., Lawton, A. E., Tennant, P., Baker, A., Gordon, C., Blundell, R., Varathalingam, A., Davies, L. A., Schmid, R. A., Cheng, S. H., Porteous, D. J., Gill, D. R. & Hyde, S. C. Electroporation enhances reporter gene expression following delivery of naked plasmid DNA to the lung. *J Gene Med* **9**, 369–380 (2007).
233. Plank, C., Zelphati, O. & Mykhaylyk, O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 1300–1331 (2011).
234. Pichon, C., Billiet, L. & Midoux, P. Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Curr Opin Biotechnol* **21**, 640–5 (2010).
235. Gill, D. R., Pringle, I. A. & Hyde, S. C. Progress and prospects: the design and production of plasmid vectors. *Gene Ther* **16**, 165–71 (2009).
236. Felgner, P. L., Barenholz, Y., Behr, J. P., Cheng, S. H., Cullis, P., Huang, L., Jessee, J. A., Seymour, L., Szoka, F., Thierry, A. R., Wagner, E. & Wu, G. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum. Gene Ther.* **8**, 511–512 (1997).
237. Kabanov, A. V., Lemieux, P., Vinogradov, S. & Alakhov, V. Pluronic block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 223–233 (2002).
238. Shapiro, D. J. & Rodwell, V. W. Diurnal variation and cholesterol regulation of hepatic HMG-CoA reductase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 867–872 (1969).
239. Wu, G. Y. & Wu, C. H. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.* **262**, 4429–4432 (1987).
240. Kwok, D. Y., Coffin, C. C., Lollo, C. P., Jovenal, J., Banaszczuk, M. G., Mullen, P., Phillips, A., Amini, A., Fabrycki, J., Bartholomew, R. M., Brostoff, S. W. & Carlo, D. J. Stabilization of poly-L-lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1444**, 171–190 (1999).
241. Colin, M., Moritz, S., Fontanges, P., Kornprobst, M., Delouis, C., Keller, M., Miller, A. D., Capeau, J., Coutelle, C. & Brahimi-Horn, M. C. The nuclear pore complex is involved in nuclear transfer of plasmid DNA condensed with an oligolysine-RGD peptide containing nuclear localisation properties. *Gene Ther.* **8**, 1643–1653 (2001).
242. Collins, L. & Fabre, J. W. A synthetic peptide vector system for optimal gene delivery to corneal endothelium. *J Gene Med* **6**, 185–194 (2004).

243. Parker, A. L., Collins, L., Zhang, X. & Fabre, J. W. Exploration of peptide motifs for potent non-viral gene delivery highly selective for dividing cells. *J Gene Med* **7**, 1545–1554 (2005).
244. Parker, A. L., Eckley, L., Singh, S., Preece, J. A., Collins, L. & Fabre, J. W. (LYS)(16)-based reducible polycations provide stable polyplexes with anionic fusogenic peptides and efficient gene delivery to post mitotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 1331–1337 (2007).
245. Choi, Y. H., Liu, F., Kim, J. S., Choi, Y. K., Park, J. S. & Kim, S. W. Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier. *J Control Release* **54**, 39–48 (1998).
246. Putnam, D., Gentry, C. A., Pack, D. W. & Langer, R. Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 1200–1205 (2001).
247. Ohsaki, M., Okuda, T., Wada, A., Hirayama, T., Niidome, T. & Aoyagi, H. In vitro gene transfection using dendritic poly(L-lysine). *Bioconjug. Chem.* **13**, 510–517 (2002).
248. Liu, G., Molas, M., Grossmann, G. A., Pasumathy, M., Perales, J. C., Cooper, M. J. & Hanson, R. W. Biological properties of poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation. *J. Biol. Chem.* **276**, 34379–34387 (2001).
249. Wolfert, M. A., Schacht, E. H., Toncheva, V., Ulbrich, K., Nazarova, O. & Seymour, L. W. Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers. *Hum. Gene Ther.* **7**, 2123–2133 (1996).
250. Maruyama, A., Watanabe, H., Ferdous, A., Katoh, M., Ishihara, T. & Akaike, T. Characterization of interpolyelectrolyte complexes between double-stranded DNA and polylysine comb-type copolymers having hydrophilic side chains. *Bioconjug. Chem.* **9**, 292–299 (1998).
251. Oupický, D., Howard, K. A., Konák, C., Dash, P. R., Ulbrich, K. & Seymour, L. W. Steric stabilization of poly-L-Lysine/DNA complexes by the covalent attachment of semitelechelic poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]. *Bioconjug. Chem.* **11**, 492–501 (2000).
252. Trubetsky, V. S., Loomis, A., Slattum, P. M., Hagstrom, J. E., Budker, V. G. & Wolff, J. A. Caged DNA does not aggregate in high ionic strength solutions. *Bioconjug. Chem.* **10**, 624–628 (1999).
253. Mintzer, M. A. & Simanek, E. E. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.* **109**, 259–302 (2009).
254. McKenzie, D. L., Smiley, E., Kwok, K. Y. & Rice, K. G. Low molecular weight disulfide cross-linking peptides as nonviral gene delivery carriers. *Bioconjug. Chem.* **11**, 901–909 (2000).
255. Midoux, P. & Monsigny, M. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug. Chem.* **10**, 406–411 (1999).
256. Bennis, J. M., Choi, J. S., Mahato, R. I., Park, J. S. & Kim, S. W. pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. *Bioconjug. Chem.* **11**, 637–645 (2000).
257. 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* **103**, 221–233 (2005).
258. Midoux, P., Mendes, C., Legrand, A., Raimond, J., Mayer, R., Monsigny, M. & Roche, A. C. Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res.* **21**, 871–878 (1993).
259. Choi, Y. H., Liu, F., Park, J. S. & Kim, S. W. Lactose-poly(ethylene glycol)-grafted poly-L-lysine as hepatoma cell-targeted gene carrier. *Bioconjug. Chem.* **9**, 708–718 (1998).
260. Nishikawa, M., Takemura, S., Yamashita, F., Takakura, Y., Meijer, D. K., Hashida, M. & Swart, P. J. Pharmacokinetics and in vivo gene transfer of plasmid DNA complexed with mannosylated poly(L-lysine) in mice. *J Drug Target* **8**, 29–38 (2000).
261. Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., Mechtler, K. & Wagner, E. Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand. *Bioconjug. Chem.* **3**, 533–539 (1992).
262. Perales, J. C., Ferkol, T., Beegen, H., Ratnoff, O. D. & Hanson, R. W. Gene transfer in vivo: sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 4086–4090 (1994).
263. Han, J. & Il Yeom, Y. Specific gene transfer mediated by galactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Int J Pharm* **202**, 151–160 (2000).

264. Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H. & Birnstiel, M. L. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 3410–3414 (1990).
265. Ferkol, T., Perales, J. C., Eckman, E., Kaetzel, C. S., Hanson, R. W. & Davis, P. B. Gene transfer into the airway epithelium of animals by targeting the polymeric immunoglobulin receptor. *J. Clin. Invest.* **95**, 493–502 (1995).
266. Mislick, K. A., Baldeschwieler, J. D., Kayyem, J. F. & Meade, T. J. Transfection of folate-polylysine DNA complexes: evidence for lysosomal delivery. *Bioconjug. Chem.* **6**, 512–515 (1995).
267. Cho, K. C., Kim, S. H., Jeong, J. H. & Park, T. G. Folate receptor-mediated gene delivery using folate-poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) conjugate. *Macromol Biosci* **5**, 512–519 (2005).
268. Wagner, E., Cotten, M., Mechtler, K., Kirlappos, H. & Birnstiel, M. L. DNA-binding transferrin conjugates as functional gene-delivery agents: synthesis by linkage of polylysine or ethidium homodimer to the transferrin carbohydrate moiety. *Bioconjug. Chem.* **2**, 226–231 (1991).
269. Curiel, D. T., Agarwal, S., Wagner, E. & Cotten, M. Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 8850–8854 (1991).
270. Mousazadeh, M., Palizban, A., Salehi, R. & Salehi, M. Gene delivery to brain cells with apoprotein E derived peptide conjugated to polylysine (apoEdp-PLL). *J Drug Target* **15**, 226–230 (2007).
271. Trubetsky, V. S., Torchilin, V. P., Kennel, S. J. & Huang, L. Use of N-terminal modified poly(L-lysine)-antibody conjugate as a carrier for targeted gene delivery in mouse lung endothelial cells. *Bioconjug. Chem.* **3**, 323–327 (1992).
272. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. & Behr, J. P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 7297–7301 (1995).
273. Ferrari, S., Moro, E., Pettenazzo, A., Behr, J. P., Zacchello, F. & Scarpa, M. ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **4**, 1100–1106 (1997).
274. Neu, M., Fischer, D. & Kissel, T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med* **7**, 992–1009 (2005).
275. Behr, J P L'éponge à protons: un moyen d'entrer dans une cellule auquel les virus n'ont pas pensé. *Medecine&Science* **12**, 56–58 (1996).
276. Tang, M. X. & Szoka, F. C. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther.* **4**, 823–832 (1997).
277. Godbey, W. T., Wu, K. K. & Mikos, A. G. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J. Biomed. Mater. Res.* **45**, 268–275 (1999).
278. Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsässer, H. P. & Kissel, T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm. Res.* **16**, 1273–1279 (1999).
279. Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. & Kissel, T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **24**, 1121–1131 (2003).
280. Kunath, K., von Harpe, A., Fischer, D., Petersen, H., Bickel, U., Voigt, K. & Kissel, T. Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J Control Release* **89**, 113–125 (2003).
281. Dunlap, D. D., Maggi, A., Soria, M. R. & Monaco, L. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3095–3101 (1997).
282. Reschel, T., Konák, C., Oupický, D., Seymour, L. W. & Ulbrich, K. Physical properties and in vitro transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations. *J Control Release* **81**, 201–217 (2002).
283. Kunath, K., Merdan, T., Hegener, O., Häberlein, H. & Kissel, T. Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer. *J Gene Med* **5**, 588–599 (2003).
284. Roche, A. C., Fajac, I., Grosse, S., Frison, N., Rondanino, C., Mayer, R. & Monsigny, M. Glycofection: facilitated gene transfer by cationic glycopolymers. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 288–297 (2003).
285. Grosse, S., Aron, Y., Honoré, I., Thévenot, G., Danel, C., Roche, A.-C., Monsigny, M. & Fajac, I. Lactosylated polyethylenimine for gene transfer into airway epithelial cells: role of the sugar moiety in cell delivery and intracellular trafficking of the complexes. *J Gene Med* **6**, 345–356 (2004).

286. Grosse, S., Thévenot, G., Aron, Y., Duverger, E., Abdelkarim, M., Roche, A.-C., Monsigny, M. & Fajac, I. In vivo gene delivery in the mouse lung with lactosylated polyethylenimine, questioning the relevance of in vitro experiments. *J Control Release* **132**, 105–112 (2008).
287. Sagara, K. & Kim, S. W. A new synthesis of galactose-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine for gene delivery to hepatocytes. *J Control Release* **79**, 271–281 (2002).
288. Gautam, A., Densmore, C. L., Golunski, E., Xu, B. & Waldrep, J. C. Transgene expression in mouse airway epithelium by aerosol gene therapy with PEI-DNA complexes. *Mol. Ther.* **3**, 551–556 (2001).
289. 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., Sumner-Jones, S. G. & Gill, D. R. The use of CpG-free plasmids to mediate persistent gene expression following repeated aerosol delivery of pDNA/PEI complexes. *Biomaterials* **33**, 5618–5627 (2012).
290. McLachlan, G., Davidson, H., Holder, E., Davies, L. A., Pringle, I. A., Sumner-Jones, S. G., Baker, A., Tennant, P., Gordon, C., Vrettou, C., Blundell, R., Hyndman, L., Stevenson, B., Wilson, A., Doherty, A., Shaw, D. J., Coles, R. L., Painter, H., Cheng, S. H., Scheule, R. K., *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**, 996–1005 (2011).
291. Densmore, C. L., Orson, F. M., Xu, B., Kinsey, B. M., Waldrep, J. C., Hua, P., Bhogal, B. & Knight, V. Aerosol delivery of robust polyethylenimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Mol. Ther.* **1**, 180–188 (2000).
292. Rudolph, C., Müller, R. H. & Rosenecker, J. Jet nebulization of PEI/DNA polyplexes: physical stability and in vitro gene delivery efficiency. *J Gene Med* **4**, 66–74 (2002).
293. Uduehi, A. N., Stammberger, U., Kubisa, B., Gugger, M., Buehler, T. A. & Schmid, R. A. Effects of linear polyethylenimine and polyethylenimine/DNA on lung function after airway instillation to rat lungs. *Mol. Ther.* **4**, 52–57 (2001).
294. Sidi, A. A., Ohana, P., Benjamin, S., Shalev, M., Ransom, J. H., Lamm, D., Hochberg, A. & Leibovitch, I. Phase I/II marker lesion study of intravesical BC-819 DNA plasmid in H19 over expressing superficial bladder cancer refractory to bacillus Calmette-Guerin. *J. Urol.* **180**, 2379–2383 (2008).
295. Haensler, J. & Szoka, F. C., Jr Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug. Chem.* **4**, 372–379 (1993).
296. Svenson, S. & Tomalia, D. A. Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2106–2129 (2005).
297. Tang, M. X., Redemann, C. T. & Szoka, F. C., Jr In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* **7**, 703–714 (1996).
298. Boas, U. & Heegaard, P. M. H. Dendrimers in drug research. *Chem Soc Rev* **33**, 43–63 (2004).
299. Cheng, Y., Xu, Z., Ma, M. & Xu, T. Dendrimers as drug carriers: applications in different routes of drug administration. *J Pharm Sci* **97**, 123–143 (2008).
300. Nagpal, K., Singh, S. K. & Mishra, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chem. Pharm. Bull.* **58**, 1423–1430 (2010).
301. Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A. N. & Davis, S. S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **51**, 81–96 (2001).
302. Lavertu, M., Méthot, S., Tran-Khanh, N. & Buschmann, M. D. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* **27**, 4815–4824 (2006).
303. Köping-Höggård, M., Vårum, K. M., Issa, M., Danielsen, S., Christensen, B. E., Stokke, B. T. & Artursson, P. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Ther.* **11**, 1441–1452 (2004).
304. Zhao, X., Yu, S.-B., Wu, F.-L., Mao, Z.-B. & Yu, C.-L. Transfection of primary chondrocytes using chitosan-pEGFP nanoparticles. *J Control Release* **112**, 223–228 (2006).
305. Sato, T., Ishii, T. & Okahata, Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials* **22**, 2075–2080 (2001).
306. Ishii, T., Okahata, Y. & Sato, T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1514**, 51–64 (2001).

307. Huang, M., Khor, E. & Lim, L.-Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm. Res.* **21**, 344–353 (2004).
308. Poste, G., Papahadjopoulos, D. & Vail, W. J. Lipid vesicles as carriers for introducing biologically active materials into cells. *Methods Cell Biol.* **14**, 33–71 (1976).
309. Gregoriadis, G. Targeting of drugs. *Nature* **265**, 407–411 (1977).
310. Ostro, M. J., Giacomoni, D., Lavelle, D., Paxton, W. & Dray, S. Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposome-mediated insertion into a human cell line. *Nature* **274**, 921–923 (1978).
311. Dimitriadis, G. J. Introduction of ribonucleic acids into cells by means of liposomes. *Nucleic Acids Res.* **5**, 1381–1386 (1978).
312. Dimitriadis, G. J. Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes. *Nature* **274**, 923–924 (1978).
313. Mukherjee, A. B., Orloff, S., Butler, J. D., Triche, T., Lalley, P. & Schulman, J. D. Entrapment of metaphase chromosomes into phospholipid vesicles (lipochromosomes): carrier potential in gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 1361–1365 (1978).
314. Fraley, R. T., Fornari, C. S. & Kaplan, S. Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: potential for gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 3348–3352 (1979).
315. Fraley, R., Wilschut, J., Düzgüneş, N., Smith, C. & Papahadjopoulos, D. Studies on the mechanism of membrane fusion: role of phosphate in promoting calcium ion induced fusion of phospholipid vesicles. *Biochemistry* **19**, 6021–6029 (1980).
316. Nicolau, C. & Sene, C. Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells. Dependence of the transfer efficiency upon the type of liposomes used and the host cell cycle stage. *Biochim. Biophys. Acta* **721**, 185–190 (1982).
317. Nicolau, C., Le Pape, A., Soriano, P., Fargette, F. & Juhel, M. F. In vivo expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 1068–1072 (1983).
318. 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.* **86**, 6982–6986 (1989).
319. Unciti-Broceta, A., Holder, E., Jones, L. J., Stevenson, B., Turner, A. R., Porteous, D. J., Boyd, A. C. & Bradley, M. Tripod-like cationic lipids as novel gene carriers. *J. Med. Chem.* **51**, 4076–4084 (2008).
320. Mounkes, L. C., Zhong, W., Cipres-Palacin, G., Heath, T. D. & Debs, R. J. Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**, 26164–26170 (1998).
321. Aissaoui, A., Oudrhiri, N., Petit, L., Hauchecorne, M., Kan, E., Sainlos, M., Julia, S., Navarro, J., Vigneron, J.-P., Lehn, J.-M. & Lehn, P. Progress in gene delivery by cationic lipids: guanidinium-cholesterol-based systems as an example. *Curr Drug Targets* **3**, 1–16 (2002).
322. Miller, A. D. The problem with cationic liposome/micelle-based non-viral vector systems for gene therapy. *Curr. Med. Chem.* **10**, 1195–1211 (2003).
323. Simberg, D., Weisman, S., Talmon, Y. & Barenholz, Y. DOTAP (and other cationic lipids): chemistry, biophysics, and transfection. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **21**, 257–317 (2004).
324. Zhang, S., Xu, Y., Wang, B., Qiao, W., Liu, D. & Li, Z. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Control Release* **100**, 165–180 (2004).
325. Montier, T., Benvegnu, 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* **8**, 296–312 (2008).
326. Labas, R., Beilvert, F., Barteau, B., David, S., Chèvre, R. & Pitard, B. Nature as a source of inspiration for cationic lipid synthesis. *Genetica* **138**, 153–168 (2010).
327. Stamatatos, L., Leventis, R., Zuckermann, M. J. & Silvius, J. R. Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes. *Biochemistry* **27**, 3917–3925 (1988).
328. Leventis, R. & Silvius, J. R. Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta* **1023**, 124–132 (1990).
329. Bennett, M. J., Aberle, A. M., Balasubramaniam, R. P., Malone, J. G., Malone, R. W. & Nantz, M. H. Cationic lipid-mediated gene delivery to murine lung: correlation of lipid hydration with in vivo transfection activity. *J. Med. Chem.* **40**, 4069–4078 (1997).

330. Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. J., Tsai, Y. J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M. & Felgner, P. L. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* **269**, 2550–2561 (1994).
331. Loeffler, J. P., Barthel, F., Feltz, P., Behr, J. P., Sassone-Corsi, P. & Feltz, A. Lipopolyamine-mediated transfection allows gene expression studies in primary neuronal cells. *J. Neurochem.* **54**, 1812–1815 (1990).
332. Guo, L. S. S., Radhakrishnan, R., Redemann, C. T., Brunette, E. N. & Debs, R. J. Cationic Liposomes Containing Noncytotoxic Phospholipid and Cholesterol Derivatives. *Journal of Liposome Research* **3**, 51–70 (1993).
333. Gao, X. & Huang, L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 280–285 (1991).
334. Hyde, S. C., Southern, K. W., Gileadi, U., Fitzjohn, E. M., Mofford, K. A., Waddell, B. E., Gooi, H. C., Goddard, C. A., Hannavy, K., Smyth, S. E., Egan, J. J., Sorgi, F. L., Huang, L., Cuthbert, A. W., Evans, M. J., Colledge, W. H., Higgins, C. F., Webb, A. K. & Gill, D. R. Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther.* **7**, 1156–1165 (2000).
335. Davies, L. A., Seguela, C., Varathalingam, A., Cheng, S. H., Hyde, S. C. & Gill, D. R. Identification of transfected cell types following non-viral gene transfer to the murine lung. *J Gene Med* **9**, 184–196 (2007).
336. Vigneron, J. P., Oudrhiri, N., Fauquet, M., Vergely, L., Bradley, J. C., Basseville, M., Lehn, P. & Lehn, J. M. Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9682–9686 (1996).
337. Oudrhiri, N., Vigneron, J. P., Peuchmaur, M., Leclerc, T., Lehn, J. M. & Lehn, P. Gene transfer by guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial cells in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 1651–1656 (1997).
338. Densmore, C. L., Giddings, T. H., Waldrep, J. C., Kinsey, B. M. & Knight, V. Gene transfer by guanidinium-cholesterol: dioleoylphosphatidyl-ethanolamine liposome-DNA complexes in aerosol. *J Gene Med* **1**, 251–264 (1999).
339. 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. *Biochim. Biophys. Acta* **1464**, 95–103 (2000).
340. Zhi, D., Zhang, S., Wang, B., Zhao, Y., Yang, B. & Yu, S. Transfection efficiency of cationic lipids with different hydrophobic domains in gene delivery. *Bioconjug Chem* **21**, 563–77 (2010).
341. Gao, X. & Huang, L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther.* **2**, 710–722 (1995).
342. Ghosh, Y. K., Visweswariah, S. S. & Bhattacharya, S. Nature of linkage between the cationic headgroup and cholesteryl skeleton controls gene transfection efficiency. *FEBS Lett.* **473**, 341–344 (2000).
343. Ghosh, Y. K., Visweswariah, S. S. & Bhattacharya, S. Advantage of the ether linkage between the positive charge and the cholesteryl skeleton in cholesterol-based amphiphiles as vectors for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **13**, 378–384 (2002).
344. Liu, D., Hu, J., Qiao, W., Li, Z., Zhang, S. & Cheng, L. Synthesis of carbamate-linked lipids for gene delivery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 3147–3150 (2005).
345. Fichert, T., Regelin, A. & Massing, U. Synthesis and transfection properties of novel non-toxic monocationic lipids. Variation of lipid anchor, spacer and head group structure. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 787–791 (2000).
346. van der Woude, I., Wagenaar, A., Meekel, A. A., ter Beest, M. B., Ruiters, M. H., Engberts, J. B. & Hoekstra, D. Novel pyridinium surfactants for efficient, nontoxic in vitro gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 1160–1165 (1997).
347. Chabaud, P., Camplo, M., Payet, D., Serin, G., Moreau, L., Barthélémy, P. & Grinstaff, M. W. Cationic nucleoside lipids for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **17**, 466–472 (2006).
348. Belmont, P., Aissaoui, A., Hauchecorne, M., Oudrhiri, N., Petit, L., Vigneron, J.-P., Lehn, J.-M. & Lehn, P. Aminoglycoside-derived cationic lipids as efficient vectors for gene transfection in vitro and in vivo. *J Gene Med* **4**, 517–526 (2002).

349. Mével, M., Sainlos, M., Chatin, B., Oudrhiri, N., Hauchecorne, M., Lambert, O., Vigneron, J.-P., Lehn, P., Pitard, B. & Lehn, J.-M. Paromomycin and neomycin B derived cationic lipids: synthesis and transfection studies. *J Control Release* **158**, 461–469 (2012).
350. Ren, T., Song, Y. K., Zhang, G. & Liu, D. Structural basis of DOTMA for its high intravenous transfection activity in mouse. *Gene Ther.* **7**, 764–768 (2000).
351. Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S. & Yan, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release* **114**, 100–109 (2006).
352. Ahmad, A., Evans, H. M., Ewert, K., George, C. X., Samuel, C. E. & Safinya, C. R. New multivalent cationic lipids reveal bell curve for transfection efficiency versus membrane charge density: lipid-DNA complexes for gene delivery. *J Gene Med* **7**, 739–748 (2005).
353. Hafez, I. M. & Cullis, P. R. Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 139–148 (2001).
354. Bottega, R. & Epand, R. M. Inhibition of protein kinase C by cationic amphiphiles. *Biochemistry* **31**, 9025–9030 (1992).
355. Floch, V., Loisel, S., Guenin, E., Hervé, A. C., Clement, J. C., Yaouanc, J. J., des Abbayes H & Férec, C. Cation substitution in cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity. *J. Med. Chem.* **43**, 4617–4628 (2000).
356. 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* **94**, 33–41 (2012).
357. Lorin, A., Flore, C., Thomas, A. & Brasseur, R. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement* **8**, 163–176
358. Tresset, G. The multiple faces of self-assembled lipidic systems. *PMC Biophys* **2**, 3 (2009).
359. Keweloh, H. & Heipieper, H. J. Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* **31**, 129–137 (1996).
360. Roach, C., Feller, S. E., Ward, J. A., Shaikh, S. R., Zerouga, M. & Stillwell, W. Comparison of cis and trans fatty acid containing phosphatidylcholines on membrane properties. *Biochemistry* **43**, 6344–6351 (2004).
361. de Kruijff, B., Cullis, P. R. & Radda, G. K. Differential scanning calorimetry and ³¹P NMR studies on sonicated and unsonicated phosphatidylcholine liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **406**, 6–20 (1975).
362. Cullis, P. R. & De Kruijff, B. ³¹P NMR studies of unsonicated aqueous dispersions of neutral and acidic phospholipids. Effects of phase transitions, p2H and divalent cations on the motion in the phosphate region of the polar headgroup. *Biochim. Biophys. Acta* **436**, 523–540 (1976).
363. Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J. & Ninham, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **72**, 1525–1568 (1976).
364. Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces (second Edition)*. (Academic press: 1992).
365. Lipowsky, R. & Sackmann, E. *Structure and Dynamics of Membranes, 1st Edition*. (Elsevier: 1995).
366. Lasic, D. D. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.* **16**, 307–321 (1998).
367. Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S. B. & Minsky, A. Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry* **32**, 7143–7151 (1993).
368. Sternberg, B., Sorgi, F. L. & Huang, L. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett.* **356**, 361–366 (1994).
369. Rädler, J. O., Koltover, I., Salditt, T. & Safinya, C. R. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* **275**, 810–814 (1997).
370. Templeton, N. S., Lasic, D. D., Frederik, P. M., Strey, H. H., Roberts, D. D. & Pavlakis, G. N. Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat. Biotechnol.* **15**, 647–652 (1997).
371. Koltover, I., Salditt, T., Rädler, J. O. & Safinya, C. R. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* **281**, 78–81 (1998).
372. Zuhorn, I. S., Bakowsky, U., Polushkin, E., Visser, W. H., Stuart, M. C. A., Engberts, J. B. F. N. & Hoekstra, D. Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency. *Mol. Ther.* **11**, 801–810 (2005).

373. Pedroso de Lima, M. C., Simões, S., Pires, P., Faneca, H. & Düzgüneş, N. Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 277–294 (2001).
374. Koynova, R., Wang, L. & Macdonald, R. C. Cationic phospholipids forming cubic phases: lipoplex structure and transfection efficiency. *Mol Pharm* **5**, 739–44 (2008).
375. Zelphati, O. & Szoka, F. C., Jr Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 11493–11498 (1996).
376. Zelphati, O. & Szoka, F. C., Jr Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm. Res.* **13**, 1367–1372 (1996).
377. Ferrari, M. E., Nguyen, C. M., Zelphati, O., Tsai, Y. & Felgner, P. L. Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes. *Hum. Gene Ther.* **9**, 341–351 (1998).
378. Eastman, S. J., Siegel, C., Tousignant, J., Smith, A. E., Cheng, S. H. & Scheule, R. K. Biophysical characterization of cationic lipid: DNA complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1325**, 41–62 (1997).
379. Bhattacharya, S. & Mandal, S. S. Interaction of surfactants with DNA. Role of hydrophobicity and surface charge on intercalation and DNA melting. *Biochim. Biophys. Acta* **1323**, 29–44 (1997).
380. Barteau, B., Chèvre, R., Letrou-Bonneval, E., Labas, R., Lambert, O. & Pitard, B. Physicochemical parameters of non-viral vectors that govern transfection efficiency. *Curr Gene Ther* **8**, 313–323 (2008).
381. Bally, Harvie, Wong, Kong, Wasan & Reimer Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **38**, 291–315 (1999).
382. Liu, C. & Zhang, N. Nanoparticles in gene therapy principles, prospects, and challenges. *Prog Mol Biol Transl Sci* **104**, 509–562 (2011).
383. Yang, J. P. & Huang, L. Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. *Gene Ther.* **4**, 950–960 (1997).
384. Son, K. K., Tkach, D. & Rosenblatt, J. Delipidated serum abolishes the inhibitory effect of serum on in vitro liposome-mediated transfection. *Biochim. Biophys. Acta* **1511**, 201–205 (2001).
385. Gautam, A., Waldrep, J. C. & Densmore, C. L. Aerosol gene therapy. *Mol. Biotechnol.* **23**, 51–60 (2003).
386. Boucher, R. C. Molecular insights into the physiology of the ‘thin film’ of airway surface liquid. *J. Physiol. (Lond.)* **516 (Pt 3)**, 631–638 (1999).
387. Ferrari, S., Geddes, D. M. & Alton, E. W. F. W. Barriers to and new approaches for gene therapy and gene delivery in cystic fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 1373–1393 (2002).
388. Sinn, P. L., Shah, A. J., Donovan, M. D. & McCray, P. B., Jr Viscoelastic gel formulations enhance airway epithelial gene transfer with viral vectors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **32**, 404–410 (2005).
389. Griesenbach, U., Meng, C., Farley, R., Wasowicz, M. Y., Munkonge, F. M., Chan, M., Stoneham, C., Sumner-Jones, S. G., Pringle, I. A., Gill, D. R., Hyde, S. C., Stevenson, B., Holder, E., Ban, H., Hasegawa, M., Cheng, S. H., Scheule, R. K., Sinn, P. L., McCray, P. B., Jr & Alton, E. W. F. W. The use of carboxymethylcellulose gel to increase non-viral gene transfer in mouse airways. *Biomaterials* **31**, 2665–2672 (2010).
390. Davies, B. & Morris, T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm. Res.* **10**, 1093–1095 (1993).
391. Bertrand, N. & Leroux, J.-C. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective. *J Control Release* **161**, 152–163 (2012).
392. Liu, Y., Liggitt, D., Zhong, W., Tu, G., Gaensler, K. & Debs, R. Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *J. Biol. Chem.* **270**, 24864–24870 (1995).
393. Zhu, N., Liggitt, D., Liu, Y. & Debs, R. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* **261**, 209–211 (1993).
394. 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. U.S.A.* **92**, 9742–9746 (1995).
395. Guénard, H. *Physiologie humaine*. (Wolters Kluwer France: 2001).
396. 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* **143**, 31–37 (2010).

397. Ogris, M., Brunner, S., Schüller, 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.* **6**, 595–605 (1999).
398. Belting, M. Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 145–151 (2003).
399. Mislick, K. A. & Baldeschwieler, J. D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 12349–12354 (1996).
400. 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* **29**, 3477–3496 (2008).
401. Xu, Y. & Szoka, F. C., Jr Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* **35**, 5616–5623 (1996).
402. Zelphati, O., Uyechi, L. S., Barron, L. G. & Szoka, F. C., Jr Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1390**, 119–133 (1998).
403. Plank, C., Mechtler, K., Szoka, F. C., Jr & Wagner, E. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1437–1446 (1996).
404. Simberg, D., Weisman, S., Talmon, Y., Faerman, A., Shoshani, T. & Barenholz, Y. The role of organ vascularization and lipoplex-serum initial contact in intravenous murine lipofection. *J. Biol. Chem.* **278**, 39858–39865 (2003).
405. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–738 (2001).
406. Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. & Bauer, S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526–1529 (2004).
407. Viglianti, G. A., Lau, C. M., Hanley, T. M., Miko, B. A., Shlomchik, M. J. & Marshak-Rothstein, A. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* **19**, 837–847 (2003).
408. U'Ren, L., Kedl, R. & Dow, S. Vaccination with liposome--DNA complexes elicits enhanced antitumor immunity. *Cancer Gene Ther.* **13**, 1033–1044 (2006).
409. Tousignant, J. D., Gates, A. L., Ingram, L. A., Johnson, C. L., Nietupski, J. B., Cheng, S. H., Eastman, S. J. & Scheule, R. K. Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice. *Hum. Gene Ther.* **11**, 2493–2513 (2000).
410. Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P. & Benoit, J.-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* **27**, 4356–4373 (2006).
411. Ross, P. C. & Hui, S. W. Polyethylene glycol enhances lipoplex-cell association and lipofection. *Biochim. Biophys. Acta* **1421**, 273–283 (1999).
412. Fang, J., Sawa, T. & Maeda, H. Factors and mechanism of 'EPR' effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS. *Adv. Exp. Med. Biol.* **519**, 29–49 (2003).
413. Calvo, P., Gouritin, B., Villarroya, H., Eclancher, F., Giannavola, C., Klein, C., Andreux, J. P. & Couvreur, P. Quantification and localization of PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles in brain and spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 1317–1326 (2002).
414. Choi, J. H., Choi, J. S., Suh, H. & Park, J. S. Effect of Poly(ethylene glycol) Grafting on Polyethylenimine as a Gene Transfer Vector in vitro. *Bulletin of the korean chemical society* **22**, 46–52 (2001).
415. Sung, S.-J., Min, S. H., Cho, K. Y., Lee, S., Min, Y.-J., Yeom, Y. I. & Park, J.-K. Effect of polyethylene glycol on gene delivery of polyethylenimine. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 492–500 (2003).
416. Li, W. & Szoka, F. C., Jr Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm. Res.* **24**, 438–449 (2007).
417. Song, L. Y., Ahkong, Q. F., Rong, Q., Wang, Z., Ansell, S., Hope, M. J. & Mui, B. Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1558**, 1–13 (2002).
418. Hatakeyama, H., Akita, H., Kogure, K., Oishi, M., Nagasaki, Y., Kihira, Y., Ueno, M., Kobayashi, H., Kikuchi, H. & Harashima, H. Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid. *Gene Ther.* **14**, 68–77 (2007).

419. Arima, H., Yamashita, S., Mori, Y., Hayashi, Y., Motoyama, K., Hattori, K., Takeuchi, T., Jono, H., Ando, Y., Hirayama, F. & Uekama, K. In vitro and in vivo gene delivery mediated by Lactosylated dendrimer/alpha-cyclodextrin conjugates (G2) into hepatocytes. *J Control Release* **146**, 106–117 (2010).
420. Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R. K., Rajeev, K. G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E. M., Zimmermann, T., Koteliansky, V., Manoharan, M. & Stoffel, M. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1149–1157 (2007).
421. Akinc, A., Querbes, W., De, S., Qin, J., Frank-Kamenetsky, M., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Rajeev, K. G., Cantley, W. L., Dorkin, J. R., Butler, J. S., Qin, L., Racie, T., Sprague, A., Fava, E., Zeigerer, A., Hope, M. J., Zerial, M., Sah, D. W. Y., Fitzgerald, K., *et al.* Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol. Ther.* **18**, 1357–1364 (2010).
422. Kreda, S. M., Pickles, R. J., Lazarowski, E. R. & Boucher, R. C. G-protein-coupled receptors as targets for gene transfer vectors using natural small-molecule ligands. *Nat. Biotechnol.* **18**, 635–640 (2000).
423. Drapkin, P. T., O’Riordan, C. R., Yi, S. M., Chiorini, J. A., Cardella, J., Zabner, J. & Welsh, M. J. Targeting the urokinase plasminogen activator receptor enhances gene transfer to human airway epithelia. *J. Clin. Invest.* **105**, 589–596 (2000).
424. Ziady, A.-G., Kelley, T. J., Milliken, E., Ferkol, T. & Davis, P. B. Functional evidence of CFTR gene transfer in nasal epithelium of cystic fibrosis mice in vivo following luminal application of DNA complexes targeted to the serpin-enzyme complex receptor. *Mol. Ther.* **5**, 413–419 (2002).
425. Elfinger, M., Maucksch, C. & Rudolph, C. Characterization of lactoferrin as a targeting ligand for nonviral gene delivery to airway epithelial cells. *Biomaterials* **28**, 3448–3455 (2007).
426. Writer, M. J., Marshall, B., Pilkington-Miksa, M. A., Barker, S. E., Jacobsen, M., Kritz, A., Bell, P. C., Lester, D. H., Tabor, A. B., Hailes, H. C., Klein, N. & Hart, S. L. Targeted gene delivery to human airway epithelial cells with synthetic vectors incorporating novel targeting peptides selected by phage display. *J Drug Target* **12**, 185–193 (2004).
427. Tagalakis, A. D., McAnulty, R. J., Devaney, J., Bottoms, S. E., Wong, J. B., Elbs, M., Writer, M. J., Hailes, H. C., Tabor, A. B., O’Callaghan, C., Jaffe, A. & Hart, S. L. A receptor-targeted nanocomplex vector system optimized for respiratory gene transfer. *Mol. Ther.* **16**, 907–915 (2008).
428. Fajac, I., Briand, P., Monsigny, M. & Midoux, P. Sugar-mediated uptake of glycosylated polylysines and gene transfer into normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum. Gene Ther.* **10**, 395–406 (1999).
429. Grosse, S., Thévenot, G., Aron, Y., Duverger, E., Abdelkarim, M., Roche, A.-C., Monsigny, M. & Fajac, I. In vivo gene delivery in the mouse lung with lactosylated polyethylenimine, questioning the relevance of in vitro experiments. *J Control Release* **132**, 105–112 (2008).
430. Portier, Y., Lainé, C., Lemiègre, L., Montier, T., Cammas-Marion, S., Lehn, P. & Benvegno, T. Folate PEGylated archaeal lipids: cell targeting and drug delivery. *J Control Release* **148**, e115–116 (2010).
431. Zhang, C., Gao, S., Jiang, W., Lin, S., Du, F., Li, Z. & Huang, W. Targeted minicircle DNA delivery using folate-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine as non-viral carrier. *Biomaterials* **31**, 6075–6086 (2010).
432. Huang, H., Yu, H., Tang, G., Wang, Q. & Li, J. Low molecular weight polyethylenimine cross-linked by 2-hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin coupled to peptide targeting HER2 as a gene delivery vector. *Biomaterials* **31**, 1830–1838 (2010).
433. Ogris, M. & Wagner, E. To be targeted: is the magic bullet concept a viable option for synthetic nucleic acid therapeutics? *Hum. Gene Ther.* **22**, 799–807 (2011).
434. Li, J. & Huang, L. Targeted delivery of RNAi therapeutics for cancer therapy. *Nanomedicine (Lond)* **5**, 1483–1486 (2010).
435. Wang, Z., Chui, W.-K. & Ho, P. C. Integrin targeted drug and gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **7**, 159–171 (2010).
436. Hillaireau, H. & Couvreur, P. Nanocarriers’ entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2873–2896 (2009).
437. Doherty, G. J. & McMahon, H. T. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 857–902 (2009).
438. Mayor, S. & Pagano, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 603–612 (2007).
439. Sahay, G., Alakhova, D. Y. & Kabanov, A. V. Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release* **145**, 182–195 (2010).

440. Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 663–700 (1986).
441. Mukherjee, S., Ghosh, R. N. & Maxfield, F. R. Endocytosis. *Physiol. Rev.* **77**, 759–803 (1997).
442. Wasylnka, J. A. & Moore, M. M. Uptake of *Aspergillus fumigatus* Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. *Infect. Immun.* **70**, 3156–3163 (2002).
443. Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H. & Harashima, H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* **58**, 32–45 (2006).
444. Midoux, P., Breuzard, G., Gomez, J. P. & Pichon, C. Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes. *Curr Gene Ther* **8**, 335–352 (2008).
445. Lechardeur, D. & Lukacs, G. L. Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous journey from the cytoplasm to the nucleus. *Hum. Gene Ther.* **17**, 882–889 (2006).
446. Thomas, M. & Klibanov, A. M. Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 14640–14645 (2002).
447. Behr, J.-P. The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. *CHIMIA International Journal for Chemistry* **51**, 34–36 (1997).
448. Sonawane, N. D., Szoka, F. C., Jr & Verkman, A. S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* **278**, 44826–44831 (2003).
449. Zuber, G., Dauty, E., Nothisen, M., Belguise, P. & Behr, J. P. Towards synthetic viruses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **52**, 245–253 (2001).
450. Bieber, T., Meissner, W., Kostin, S., Niemann, A. & Elsasser, H.-P. Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J Control Release* **82**, 441–454 (2002).
451. Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A. M. & Langer, R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med* **7**, 657–663 (2005).
452. Medina-Kauwe, L. K., Xie, J. & Hamm-Alvarez, S. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther.* **12**, 1734–1751 (2005).
453. Behr, J.-P. Synthetic Gene Transfer Vectors II: Back to the Future. *Accounts of Chemical Research* (2012).doi:10.1021/ar200213g
454. Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J.-J. & Jaffrès, P.-A. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 166–178 (2009).
455. Abe, A., Miyanohara, A. & Friedmann, T. Enhanced gene transfer with fusogenic liposomes containing vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *J. Virol.* **72**, 6159–6163 (1998).
456. Futaki, S., Masui, Y., Nakase, I., Sugiura, Y., Nakamura, T., Kogure, K. & Harashima, H. Unique features of a pH-sensitive fusogenic peptide that improves the transfection efficiency of cationic liposomes. *J Gene Med* **7**, 1450–1458 (2005).
457. Tu, Y. & Kim, J. A fusogenic segment of glycoprotein H from herpes simplex virus enhances transfection efficiency of cationic liposomes. *J Gene Med* **10**, 646–654 (2008).
458. Kichler, A., Mechtler, K., Behr, J. P. & Wagner, E. Influence of membrane-active peptides on lipospermine/DNA complex mediated gene transfer. *Bioconjug. Chem.* **8**, 213–221 (1997).
459. Wagner Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **38**, 279–289 (1999).
460. Zhang, X., Collins, L. & Fabre, J. W. A powerful cooperative interaction between a fusogenic peptide and lipofectamine for the enhancement of receptor-targeted, non-viral gene delivery via integrin receptors. *J Gene Med* **3**, 560–568 (2001).
461. Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M. & Birnstiel, M. L. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 7934–7938 (1992).
462. Li, W., Nicol, F. & Szoka, F. C., Jr GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 967–985 (2004).
463. Simões, S., Moreira, J. N., Fonseca, C., Düzgüneş, N. & de Lima, M. C. P. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 947–965 (2004).

464. 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* **9**, 1462–1471 (2008).
465. Mével, M., Neveu, C., Gonçalves, C., Yaouanc, J.-J., Pichon, C., Jaffrès, P.-A. & Midoux, P. Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays. *Chem. Commun. (Camb.)* 3124–3126 (2008).doi:10.1039/b805226c
466. Mével, M., Kamaly, N., Carmona, S., Oliver, M. H., Jorgensen, M. R., Crowther, C., Salazar, F. H., Marion, P. L., Fujino, M., Natori, Y., Thanou, M., Arbuthnot, P., Yaouanc, J.-J., Jaffrès, P. A. & Miller, A. D. DODAG; a versatile new cationic lipid that mediates efficient delivery of pDNA and siRNA. *J Control Release* **143**, 222–232 (2010).
467. Chan, C.-L., Majzoub, R. N., Shirazi, R. S., Ewert, K. K., Chen, Y.-J., Liang, K. S. & Safinya, C. R. Endosomal escape and transfection efficiency of PEGylated cationic liposome-DNA complexes prepared with an acid-labile PEG-lipid. *Biomaterials* **33**, 4928–4935 (2012).
468. Lechardeur, D., Sohn, K. J., Haardt, M., Joshi, P. B., Monck, M., Graham, R. W., Beatty, B., Squire, J., O’Brodivich, H. & Lukacs, G. L. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther.* **6**, 482–497 (1999).
469. Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A. & Welsh, M. J. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* **270**, 18997–19007 (1995).
470. Mortimer, I., Tam, P., MacLachlan, I., Graham, R. W., Saravolac, E. G. & Joshi, P. B. Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Ther.* **6**, 403–411 (1999).
471. Tseng, W. C., Haselton, F. R. & Giorgio, T. D. Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1445**, 53–64 (1999).
472. Hébert, E. Improvement of exogenous DNA nuclear importation by nuclear localization signal-bearing vectors: a promising way for non-viral gene therapy? *Biol. Cell* **95**, 59–68 (2003).
473. Lukacs, G. L., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N. & Verkman, A. S. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* **275**, 1625–1629 (2000).
474. Dauty, E. & Verkman, A. S. Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm: a new barrier for non-viral gene delivery. *J. Biol. Chem.* **280**, 7823–7828 (2005).
475. Rosazza, C., Escoffre, J.-M., Zumbusch, A. & Rols, M.-P. The actin cytoskeleton has an active role in the electrotransfer of plasmid DNA in mammalian cells. *Mol. Ther.* **19**, 913–921 (2011).
476. Cohen, R. N., van der Aa, M. A. E. M., Macaraeg, N., Lee, A. P. & Szoka, F. C., Jr Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection. *J Control Release* **135**, 166–174 (2009).
477. Glover, D. J., Leyton, D. L., Moseley, G. W. & Jans, D. A. The efficiency of nuclear plasmid DNA delivery is a critical determinant of transgene expression at the single cell level. *J Gene Med* **12**, 77–85 (2010).
478. Lam, A. P. & Dean, D. A. Progress and prospects: nuclear import of nonviral vectors. *Gene Ther.* **17**, 439–447 (2010).
479. Miller, A. M., Munkonge, F. M., Alton, E. W. F. W. & Dean, D. A. Identification of protein cofactors necessary for sequence-specific plasmid DNA nuclear import. *Mol. Ther.* **17**, 1897–1903 (2009).
480. Degiulio, J. V., Kaufman, C. D. & Dean, D. A. The SP-C promoter facilitates alveolar type II epithelial cell-specific plasmid nuclear import and gene expression. *Gene Ther.* **17**, 541–549 (2010).
481. Miller, A. M. & Dean, D. A. Cell-specific nuclear import of plasmid DNA in smooth muscle requires tissue-specific transcription factors and DNA sequences. *Gene Ther.* **15**, 1107–1115 (2008).
482. Breuzard, G., Tertilt, M., Gonçalves, C., Cheradame, H., Géguan, P., Pichon, C. & Midoux, P. 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**, e71 (2008).
483. van Gaal, E. V. B., Oosting, R. S., van Eijk, R., Bakowska, M., Feyen, D., Kok, R. J., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. A. & Mastrobattista, E. DNA nuclear targeting sequences for non-viral gene delivery. *Pharm. Res.* **28**, 1707–1722 (2011).
484. Schneider, S., Lenz, D., Holzer, M., Palme, K. & Süß, R. Intracellular FRET analysis of lipid/DNA complexes using flow cytometry and fluorescence imaging techniques. *J Control Release* **145**, 289–296 (2010).

485. Chen, H. H., Ho, Y.-P., Jiang, X., Mao, H.-Q., Wang, T.-H. & Leong, K. W. Quantitative comparison of intracellular unpacking kinetics of polyplexes by a model constructed from quantum dot-FRET. *Mol. Ther.* **16**, 324–332 (2008).
486. Wang, Z., Jin, L., Yuan, Z., Wegrzyn, G. & Wegrzyn, A. Classification of plasmid vectors using replication origin, selection marker and promoter as criteria. *Plasmid* **61**, 47–51 (2009).
487. Chen, Z.-Y., He, C.-Y., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol. Ther.* **8**, 495–500 (2003).
488. Gene transfer medicinal products for human use. *European Pharmacopoeia* **6.0**, 667–676 (2007).
489. Azzoni, A. R., Ribeiro, S. C., Monteiro, G. A. & Prazeres, D. M. F. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. *J Gene Med* **9**, 392–402 (2007).
490. Magnusson, T., Haase, R., Schleef, M., Wagner, E. & Ogris, M. Sustained, high transgene expression in liver with plasmid vectors using optimized promoter-enhancer combinations. *The Journal of Gene Medicine* **13**, 382–391 (2011).
491. Xu, L., Daly, T., Gao, C., Flotte, T. R., Song, S., Byrne, B. J., Sands, M. S. & Parker Ponder, K. CMV-beta-actin promoter directs higher expression from an adeno-associated viral vector in the liver than the cytomegalovirus or elongation factor 1 alpha promoter and results in therapeutic levels of human factor X in mice. *Hum. Gene Ther.* **12**, 563–573 (2001).
492. Collas, P. Modulation of plasmid DNA methylation and expression in zebrafish embryos. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4454–4461 (1998).
493. Herweijer, H., Zhang, G., Subbotin, V. M., Budker, V., Williams, P. & Wolff, J. A. Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *J Gene Med* **3**, 280–291 (2001).
494. Le Gall, T., Loizeau, D., Picquet, E., Carmoy, N., Yaouanc, J.-J., Burel-Deschamps, L., Delépine, P., Giamarchi, P., Jaffrès, P.-A., Lehn, P. & Montier, T. A novel cationic lipophosphoramidate with diunsaturated lipid chains: synthesis, physicochemical properties, and transfection activities. *J. Med. Chem.* **53**, 1496–1508 (2010).
495. Brooks, A. R., Harkins, R. N., Wang, P., Qian, H. S., Liu, P. & Rubanyi, G. M. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* **6**, 395–404 (2004).
496. Argyros, O., Wong, S. P., Niceta, M., Waddington, S. N., Howe, S. J., Coutelle, C., Miller, A. D. & Harbottle, R. P. Persistent episomal transgene expression in liver following delivery of a scaffold/matrix attachment region containing non-viral vector. *Gene Ther.* **15**, 1593–1605 (2008).
497. Uematsu, S. & Akira, S. Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handb Exp Pharmacol* 1–20 (2008).doi:10.1007/978-3-540-72167-3_1
498. Tan, Y., Li, S., Pitt, B. R. & Huang, L. The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo. *Hum. Gene Ther.* **10**, 2153–2161 (1999).
499. 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* **97**, 3074–3083 (2008).
500. Mitsui, M., Nishikawa, M., Zang, L., Ando, M., Hattori, K., Takahashi, Y., Watanabe, Y. & Takakura, Y. Effect of the content of unmethylated CpG dinucleotides in plasmid DNA on the sustainability of transgene expression. *J Gene Med* **11**, 435–443 (2009).
501. Hodges, B. L., Taylor, K. M., Joseph, M. F., Bourgeois, S. A. & Scheule, R. K. Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides. *Mol. Ther.* **10**, 269–278 (2004).
502. 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., Chan, M., Li, H., Yew, N. S., Cheng, S. H., Boyd, A. C., Davies, J. C., Griesenbach, U., Porteous, D. J., Sheppard, D. N., Munkonge, F. M., *et al.* CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat. Biotechnol.* **26**, 549–551 (2008).
503. Chen, Z.-Y., Riu, E., He, C.-Y., Xu, H. & Kay, M. A. Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol. Ther.* **16**, 548–556 (2008).
504. Argyros, O., Wong, S.-P. & Harbottle, R. P. Non-viral episomal modification of cells using S/MAR elements. *Expert Opin Biol Ther* **11**, 1177–1191 (2011).
505. Hackett, P. B. Integrating DNA vectors for gene therapy. *Mol. Ther.* **15**, 10–12 (2007).

506. VandenDriessche, T., Ivics, Z., Izsvák, Z. & Chuah, M. K. L. Emerging potential of transposons for gene therapy and generation of induced pluripotent stem cells. *Blood* **114**, 1461–1468 (2009).
507. Hackett, P. B., Largaespada, D. A. & Cooper, L. J. N. A transposon and transposase system for human application. *Mol. Ther.* **18**, 674–683 (2010).
508. Liu, F., Qi, H., Huang, L. & Liu, D. Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration. *Gene Ther.* **4**, 517–523 (1997).
509. Li, S., Wu, S. P., Whitmore, M., Loeffert, E. J., Wang, L., Watkins, S. C., Pitt, B. R. & Huang, L. Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipidic vectors. *Am. J. Physiol.* **276**, L796–804 (1999).
510. Sakurai, H., Sakurai, F., Kawabata, K., Sasaki, T., Koizumi, N., Huang, H., Tashiro, K., Kurachi, S., Nakagawa, S. & Mizuguchi, H. Comparison of gene expression efficiency and innate immune response induced by Ad vector and lipoplex. *J Control Release* **117**, 430–437 (2007).
511. Sakurai, H., Kawabata, K., Sakurai, F., Nakagawa, S. & Mizuguchi, H. Innate immune response induced by gene delivery vectors. *Int J Pharm* **354**, 9–15 (2008).
512. Zhang, J.-S., Liu, F. & Huang, L. Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 689–698 (2005).
513. Ishida, T., Ichihara, M., Wang, X., Yamamoto, K., Kimura, J., Majima, E. & Kiwada, H. Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J Control Release* **112**, 15–25 (2006).
514. Judge, A., McClintock, K., Phelps, J. R. & Maclachlan, I. Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to PEGylated liposomes. *Mol. Ther.* **13**, 328–337 (2006).
515. Tagami, T., Nakamura, K., Shimizu, T., Yamazaki, N., Ishida, T. & Kiwada, H. CpG motifs in pDNA-sequences increase anti-PEG IgM production induced by PEG-coated pDNA-lipoplexes. *J Control Release* **142**, 160–166 (2010).
516. Ishida, T. & Kiwada, H. Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. *Int J Pharm* **354**, 56–62 (2008).
517. Le Bolc'h G., Le Bris N., Yaouanc J.-J., Clement J.-C., des Abbayes H., Audrezet M.-P. & Ferec C. Cationic Phosphonolipids as non Viral Vectors for DNA Transfection. *Tetrahedron Letters* **36**, 6681–6684 (1995).
518. Floch, V., Le Bolc'h, G., Audrezet, M. P., Yaouanc, J. J., Clément, J. C., des Abbayes, H., Mercier, B., Abgrall, J. F. & Férec, C. Cationic phosphonolipids as non viral vectors for DNA transfection in hematopoietic cell lines and CD34+ cells. *Blood Cells Mol. Dis.* **23**, 69–87 (1997).
519. Floch, V., Audrezet, M. P., Guillaume, C., Gobin, E., Le Bolch, G., Clement, J. C., Yaouanc, J. J., Des Abbayes, H., Mercier, B., Leroy, J. P., Abgrall, J. F. & Ferec, C. Transgene expression kinetics after transfection with cationic phosphonolipids in hematopoietic non adherent cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1371**, 53–70 (1998).
520. Guillaume-Gable, C., Floch, V., Mercier, B., Audrezet, M. P., Gobin, E., Le Bolch, G., Yaouanc, J. J., Clément, J. C., des Abbayes, H., Leroy, J. P., Morin, V. & Férec, C. Cationic phosphonolipids as nonviral gene transfer agents in the lungs of mice. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2309–2319 (1998).
521. Delépine, P., Guillaume, C., Montier, T., Clément, J. C., Yaouanc, J. J., Des Abbayes, H., Berthou, F., Le Pape, A. & Férec, C. Biodistribution study of phosphonolipids: a class of non-viral vectors efficient in mice lung-directed gene transfer. *J Gene Med* **5**, 600–608 (2003).
522. Guénin, Hervé, Floch, Loisel, Yaouanc, Clément, Férec & 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. Engl.* **39**, 629–631 (2000).
523. Stekar, J., Nössner, G., Kutscher, B., Engel, J. & Hilgard, P. Synthesis, Antitumor Activity, and Tolerability of Phospholipids Containing Nitrogen Homologues. *Angewandte Chemie International Edition in English* **34**, 238–240 (1995).
524. Delépine, P., Guillaume, C., Floch, V., Loisel, S., Yaouanc, J., Clément, J., Des Abbayes, H. & Férec, C. Cationic phosphonolipids as nonviral vectors: in vitro and in vivo applications. *J Pharm Sci* **89**, 629–638 (2000).
525. Yamauchi, H., Kaise, T. & Yamamura, Y. Metabolism and excretion of orally administered arsenobetaine in the hamster. *Bull Environ Contam Toxicol* **36**, 350–355 (1986).

526. Clement J.-C., Delépine, P., Des Abbayes, H., Férec, C., Montier, T. & Yaouanc J.-J. French patent N°0214044. (2002).
527. Montier, T., Delépine, P., Le Ny, K., Fichou, Y., Le Bris, M., Hardy, E., Picquet, E., Clément, J. C., Yaouanc, J. J. & Férec, C. KLN-5: a safe monocationic lipophosphoramidate to transfect efficiently haematopoietic cell lines and human CD34+ cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1665**, 118–133 (2004).
528. Montier, T., Delépine, P., Marianowski, R., Le Ny, K., Le Bris, M., Gillet, D., Potard, G., Mondine, P., Frachon, I., Yaouanc, J.-J., Clément, J.-C., Des Abbayes, H. & Férec, C. CFTR transgene expression in primary DeltaF508 epithelial cell cultures from human nasal polyps following gene transfer with cationic phosphonolipids. *Mol. Biotechnol.* **26**, 193–206 (2004).
529. Picquet, E., Le Ny, K., Delépine, P., Montier, T., Yaouanc, J.-J., Cartier, D., des Abbayes, H., Férec, C. & Clément, J.-C. Cationic lipophosphoramidates and lipophosphoguanidines are very efficient for in vivo DNA delivery. *Bioconjug. Chem.* **16**, 1051–1053 (2005).
530. Mével, M., Montier, T., Lamarche, F., Delépine, P., Le Gall, T., Yaouanc, J.-J., Jaffrès, P.-A., Cartier, D., Lehn, P. & Clément, J.-C. Dicationic lipophosphoramidates as DNA carriers. *Bioconjug. Chem.* **18**, 1604–1611 (2007).
531. Fraix, A., Montier, T., Carmoy, N., Loizeau, D., Burel-Deschamps, L., Le Gall, T., Giamarchi, P., Couthon-Gourvès, H., Haelters, J.-P., Lehn, P. & Jaffrès, P.-A. Cationic lipo-thiophosphoramidates for gene delivery: synthesis, physico-chemical characterization and gene transfection activity--comparison with lipo-phosphoramidates. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 2422–2432 (2011).
532. Batzri, S. & Korn, E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 1015–1019 (1973).
533. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).
534. Snouwaert, J. N., Brigman, K. K., Latour, A. M., Malouf, N. N., Boucher, R. C., Smithies, O. & Koller, B. H. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* **257**, 1083–1088 (1992).
535. Rose, A. C., Goddard, C. A., Colledge, W. H., Cheng, S. H., Gill, D. R. & Hyde, S. C. Optimisation of real-time quantitative RT-PCR for the evaluation of non-viral mediated gene transfer to the airways. *Gene Ther.* **9**, 1312–1320 (2002).
536. Mackay, I. M., Arden, K. E. & Nitsche, A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1292–1305 (2002).
537. Poitras, E. & Houde, A. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* **2**, 2–11 (2002).
538. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K. & Farokhzad, O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* **5**, 505–515 (2008).
539. Fraix, A., Montier, T., Le Gall, T., Sevrain, C. M., Carmoy, N., Lindberg, M. F., Lehn, P. & Jaffrès, P.-A. Lipothiophosphoramidates for gene delivery: critical role of the cationic polar headgroup. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 2051–2058 (2012).
540. Pitard, B., Oudrhiri, N., Lambert, O., Vivien, E., Masson, C., Wetzter, B., Hauchecorne, M., Scherman, D., Rigaud, J. L., Vigneron, J. P., Lehn, J. M. & Lehn, P. Sterically stabilized BGTC-based lipoplexes: structural features and gene transfection into the mouse airways in vivo. *J Gene Med* **3**, 478–87 (2001).
541. Choi, H. S., Ashitate, Y., Lee, J. H., Kim, S. H., Matsui, A., Insin, N., Bawendi, M. G., Semmler-Behnke, M., Frangioni, J. V. & Tsuda, A. Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat. Biotechnol.* **28**, 1300–1303 (2010).
542. Navarro, Oudrhiri, Fabrega & Lehn Gene delivery systems: Bridging the gap between recombinant viruses and artificial vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **30**, 5–11 (1998).
543. Nakamura, T., Akita, H., Yamada, Y., Hatakeyama, H. & Harashima, H. A multifunctional envelope-type nanodevice for use in nanomedicine: concept and applications. *Acc. Chem. Res.* **45**, 1113–1121 (2012).
544. Kim, H. A., Park, J. H., Lee, S., Choi, J. S., Rhim, T. & Lee, M. Combined delivery of dexamethasone and plasmid DNA in an animal model of LPS-induced acute lung injury. *J Control Release* **156**, 60–69 (2011).
545. Resina, S., Prevot, P. & Thierry, A. R. Physico-chemical characteristics of lipoplexes influence cell uptake mechanisms and transfection efficacy. *PLoS ONE* **4**, e6058 (2009).

546. Manunta, M. D. I., McAnulty, R. J., Tagalakis, A. D., Bottoms, S. E., Campbell, F., Hailes, H. C., Tabor, A. B., Laurent, G. J., O'Callaghan, C. & Hart, S. L. Nebulisation of receptor-targeted nanocomplexes for gene delivery to the airway epithelium. *PLoS ONE* **6**, e26768 (2011).
547. Sanders, N. N., De Smedt, S. C., Cheng, S. H. & Demeester, J. Pegylated GL67 lipoplexes retain their gene transfection activity after exposure to components of CF mucus. *Gene Ther.* **9**, 363–371 (2002).
548. Kitson, C., Angel, B., Judd, D., Rothery, S., Severs, N. J., Dewar, A., Huang, L., Wadsworth, S. C., Cheng, S. H., Geddes, D. M. & Alton, E. W. The extra- and intracellular barriers to lipid and adenovirus-mediated pulmonary gene transfer in native sheep airway epithelium. *Gene Ther.* **6**, 534–546 (1999).
549. Jacquemet, A., Barbeau, J., Lemiègre, L. & Benvegnu, T. Archaeal tetraether bipolar lipids: Structures, functions and applications. *Biochimie* **91**, 711–717 (2009).
550. Hida, K., Lai, S. K., Suk, J. S., Won, S. Y., Boyle, M. P. & Hanes, J. Common gene therapy viral vectors do not efficiently penetrate sputum from cystic fibrosis patients. *PLoS ONE* **6**, e19919 (2011).
551. Suk, J. S., Boylan, N. J., Trehan, K., Tang, B. C., Schneider, C. S., Lin, J. M., Boyle, M. P., Zeitlin, P. L., Lai, S. K., Cooper, M. J. & Hanes, J. N-acetylcysteine Enhances Cystic Fibrosis Sputum Penetration and Airway Gene Transfer by Highly Compacted DNA Nanoparticles. *Mol Ther* (2011).doi:10.1038/mt.2011.160 mt2011160 [pii]
552. Sun, X., Sui, H., Fisher, J. T., Yan, Z., Liu, X., Cho, H.-J., Joo, N. S., Zhang, Y., Zhou, W., Yi, Y., Kinyon, J. M., Lei-Butters, D. C., Griffin, M. A., Naumann, P., Luo, M., Ascher, J., Wang, K., Frana, T., Wine, J. J., Meyerholz, D. K., *et al.* Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **120**, 3149–3160 (2010).
553. Stoltz, D. A., Meyerholz, D. K., Pezzulo, A. A., Ramachandran, S., Rogan, M. P., Davis, G. J., Hanfland, R. A., Wohlford-Lenane, C., Dohrn, C. L., Bartlett, J. A., Nelson, G. A., 4th, Chang, E. H., Taft, P. J., Ludwig, P. S., Estin, M., Hornick, E. E., Launspach, J. L., Samuel, M., Rokhlina, T., Karp, P. H., *et al.* Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci Transl Med* **2**, 29ra31 (2010).
554. Caci, E., Melani, R., Pedemonte, N., Yueksekdag, G., Ravazzolo, R., Rosenecker, J., Galiotta, L. J. V. & Zegarra-Moran, O. Epithelial sodium channel inhibition in primary human bronchial epithelia by transfected siRNA. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **40**, 211–216 (2009).

Sites internet :

<http://www.vaincrelamuco.org>
<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/chromosomallocation.jpg>
<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>
<http://www.cff.org>
<http://www.cff.org/research/DrugDevelopmentPipeline/>
<http://www.hwrc.org/Health/Disease/Photos/Pulmonary%20circulation.jpg>
<http://www.virtualmedicalcentre.com>
<http://www.mc.vanderbilt.edu/histology/labmanual2002/labsection2/Respiratory03.htm>
<http://www.wikipedia.fr>
http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/therapie_genique/therapie_genique.htm
<http://www.abedia.com/wiley/indications.php>
<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>
<http://www.afm-telethon.fr/>
<http://www.biocancell.com/clinical-trials/bladdertrial>
<http://www.college-de-france.fr>
<http://collettemathieu.blog.lemonde.fr/category/cours-sur-la-rigidite-arterielle/la-rigidite-arterielle/>

Communications orales citées :

- S. Hacein-Bey, *Clinical benefit after SIN-retroviral gene therapy in SCID-X1*, 15^{ème} congrès de la société américaine de thérapie génique et cellulaire (ASGCT) ; Philadelphie, mai 2012
- N.W. Keiser, *CFTR gene correction of only the surface airway epithelium restores antimicrobial activity to cftr knockout ferret tracheas ex vivo*. 15^{ème} congrès de la société américaine de thérapie génique et cellulaire (ASGCT) ; Philadelphie, mai 2012
- Dr. Luis Garcia, *mRNA-based therapeutics for Duchenne muscular dystrophy*, 4^{ème} congrès international de Myologie, Lille, mai 2011
- Communication orale, J.P. Behr, *Thérapie génique non-virale*, Collège de France, Paris, 2011

Autres :

- Brevet International PCT n°FR03/50116 -07/11/2003
- Communiqué de presse de l'Agence Européenne du Médicament (EMA). *Positive opinion on the marketing authorisation of Glybera (alipogene tiparvovec)*; 20 juillet 2012.

Annexe :

Lipothiophosphoramidates for gene delivery: critical role of the cationic polar headgroup (Electronic Supplementary Materials)

Publications et communications

- **Publications :**

- ✓ Fraix A, Montier T, Le Gall T, Sevrain CM, Carmoy N, Lindberg ME, Lehn P, Jaffrès P-A. *Lipothiophosphoramidates for gene delivery: critical role of the cationic polar headgroup*. **Org. Biomol. Chem.** 2012 mars;10(10):2051-2058.
- ✓ Lindberg MF, 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 sept;33(26):6240-6253.

- **Oral presentations :**

- **13th French Cystic Fibrosis Young Investigator Meeting;** 24th April, 2012 – Paris (Institut Pasteur), France.
Thérapie génique de la mucoviscidose : Impact du plasmide sur l'efficacité de transfection de lipides cationiques originaux in vivo.
Lindberg MF, Le Gall T, Carmoy N, Hyde SC, Gill DR, Berchel M, Fraix A, Jaffrès P, Lehn P, Montier T.
- **16th Scientific GTRV Meeting;** 5 – 7 December 2011, Bruxelles. Belgium.
Gene therapy of cystic fibrosis: plasmid DNA contribution on in vivo lipid-based transfection efficacy
Lindberg MF, Le Gall T, Carmoy N, Hyde SC, Gill DR, Berchel M, Fraix A, Jaffrès P, Lehn P, Montier T.
- **5th European Cystic Fibrosis Young Investigator Meeting;** 23-26 August, 2011 - Lille, France.
Gene therapy of cystic fibrosis: plasmid DNA contribution on in vivo lipid-based transfection efficacy.
Lindberg MF, Le Gall T, Carmoy N, Hyde SC, Gill DR, Berchel M, Fraix A, Jaffrès P, Lehn P, Montier T.
- **10th Annual Meeting of the “French Society of Cell and Gene Therapy”;** 6-8 June, 2011 - Nantes, France. Hum. Gene Ther. 2011 June;22:A-1.
Gene therapy of cystic fibrosis: plasmid DNA contribution on in vivo lipid-based transfection efficacy.
Lindberg MF, Le Gall T, Carmoy N, Hyde SC, Gill DR, Berchel M., Fraix A, Jaffrès P, Lehn P, Montier T.
- **32nd European Cystic Fibrosis Conference;** 10-13 June 2009, Brest, France.
Variations on hydrophobic domains in Lipophosphoramidates result in lung transfection's improvement and lower toxicity.
Montier T, Le Gall T, Carmoy N, Lindberg MF, Létocart E, Fraix A, Lorilleux C, Yaouanc JJ, Delépine P, Gillet D, Jaffrès PA, Lehn P.

- **Poster presentations :**

- **15th Annual Meeting of the “American Society of Gene and Cell Therapy” (ASGCT);** Philadelphia, USA, May 16-19, 2012. Mol. Ther. 2012 May; 20(supplement 1).
Gene Therapy of Cystic Fibrosis: Impact of Plasmid DNA on In Vivo Lipid-Based Transfection Efficacy.
Lindberg MF, Le Gall T, Carmoy N, Hyde SC, Gill DR, Berchel M, Fraix A, Jaffrès P, Lehn P, Montier T.
- **5th European Cystic Fibrosis Young Investigator Meeting;** 23-26 August, 2011 - Lille, France
Gene therapy of cystic fibrosis: plasmid DNA contribution on in vivo lipid-based transfection efficacy. Lindberg MF, Le Gall T, Carmoy N, Hyde SC, Gill DR, Berchel M, Fraix A, Jaffrès P, Lehn P, Montier T.
- **4th International Congress of Myology ;** 9-13 May, 2011 - Lille, France.
Long-term and recoverable intramuscular transgene expression using CpG-free plasmid as revealed by in vivo bioluminescence imaging.
Le Gall T, Lindberg ME, Hyde SC, Gill DR, Lehn P, Montier T.
- **12th French Cystic Fibrosis Young Investigator Meeting ;** 4th March, 2011 – Paris (Institut Pasteur), France.
Thérapie génique de la mucoviscidose : Impact du plasmide sur l’efficacité de transfection de lipides cationiques originaux in vivo.
Lindberg MF, Carmoy N, Le Gall T, Hyde SC, Gill DR, Berchel M, Fraix A, Jaffrès P, Lehn P, Montier T.
- **13th Annual Meeting of the “American Society of Gene and Cell Therapy” (ASGCT);** Washington, DC, USA, May 19-22, 2010. Mol. Ther. 2010 May; 18 (supplement 1).
(1) *A novel cationic lipophosphoramidate with phytanyl chains: Gain in transfection efficiency and clinical approach concerning the response to lipofection.* Lindberg MF, Carmoy N, Lorilleux C, Fraix A, Le Gall T, Lehn P, Jaffrès P, Montier T.
(2) *Folate linked targeting systems increase transfection efficiency and specificity in human epithelial cells.* Carmoy N, Mornet E, Lainé C, Lemiègre L, Le Gall T, Gillet D, Lindberg ME, Marianowski R, Lehn P, Benvegny T, Montier T.

*Le jour tombe. Un grand apaisement se fait dans les pauvres esprits fatigués
du labeur de la journée ; et leurs pensées prennent maintenant les couleurs
tendres et indécises du crépuscule.*

Charles Baudelaire, *Le crépuscule du soir*

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

L'utilisation des acides nucléiques est une approche thérapeutique très prometteuse en nanomédecine, notamment dans le but de pallier un défaut génétique. La thérapie génique de la mucoviscidose, à savoir le transfert d'une copie normale du gène CFTR dans les cellules épithéliales du tractus respiratoire des patients, nécessite des outils de vectorisation particulièrement efficaces et adaptés à une exploitation en clinique humaine. Si les virus recombinants sont très performants, leur immunogénicité et leur potentiel oncogénique sont autant d'inconvénients majeurs que ne présentent pas les vecteurs synthétiques, et notamment les lipides cationiques. Le sujet de ma thèse a concerné le développement et l'optimisation de lipides cationiques pour le transfert de gènes à destination de l'épithélium respiratoire. Au cours de mes travaux, nous avons pu mettre en évidence que l'utilisation de chaînes aliphatiques phytanyles, sur les arsénolipides de dernière génération, permettait la formation de phases hexagonales inverses, une organisation supramoléculaire connue pour déstabiliser les vésicules d'endocytose et ainsi favoriser la délivrance cytosolique des acides nucléiques. Comparé à ses analogues, ce nouveau composé est particulièrement efficace et peu toxique in vitro, sur différentes lignées de cellules épithéliales bronchiques, mais également in vivo chez la souris, permettant d'augmenter et de rallonger l'expression du transgène dans les cellules épithéliales pulmonaires après administration intraveineuse (IV). La transfection effective des cellules épithéliales pulmonaires par voie IV a, en outre, été confirmée en utilisant un plasmide codant CFTR, sur un modèle murin de la mucoviscidose. Nous nous sommes également intéressés aux différentes atteintes physiologiques provoquées par l'administration systémique de lipoplexes, ainsi qu'à l'utilisation d'un plasmide optimisé pour permettre une expression du transgène soutenue. Une réponse inflammatoire aiguë ainsi qu'une cytolyse hépatique sont systématiquement observées dans les premiers jours suivant l'administration des complexes, indépendamment de la présence de motifs immunostimulateurs C-G sur le plasmide utilisé, de la durée d'expression du transgène, ou encore de la nature du lipide. Ces phénomènes ne durent que quelques jours, alors que les durées d'expression du transgène obtenues peuvent aller jusqu'à plus de 40 jours en utilisant un plasmide performant. Des réadministrations efficaces de lipoplexes sont possibles, mais nécessitent un délai suffisant entre chaque injection, soulignant l'importance d'utiliser une construction d'acides nucléiques permettant une expression du transgène d'intérêt forte et stable dans le temps. L'administration intratrachéale de complexes judicieusement préparés a par ailleurs montré, par imagerie de bioluminescence, des cinétiques d'expression visibles jusqu'à plus de 100 jours après une seule administration. Ces résultats marquent un réel progrès dans l'optimisation structurale des vecteurs développés au laboratoire ainsi que dans leur formulation, et nous encouragent à exploiter encore davantage leurs potentiels pour le transfert de gènes à destination du poumon, en se rapprochant encore plus des réalités cliniques d'un traitement adapté à la mucoviscidose.

Mots clés : Transfection, lipide cationique, vectorisation, mucoviscidose, CFTR, bioluminescence, hépatotoxicité, inflammation, immunogénicité.

Development, formulation and biodistribution of synthetic vectors for gene transfer in the context of gene therapy of cystic fibrosis

The use of nucleic acids is a promising therapeutic approach in nanomedicine, in particular with the aim of remedying a genetic defect. Gene therapy for cystic fibrosis, namely the transfer of a normal copy of the *CFTR* gene into the epithelial cells of the respiratory tract of patients, requires particularly effective vectoring tools suitable for use in human clinics. If recombinant viruses are very efficient, their immunogenicity and oncogenic potential are all major drawbacks that synthetic vectors, and in particular cationic lipids, do not have. The subject of my thesis concerned the development and optimization of cationic lipids for gene transfer to the respiratory epithelium.

In this work, we were able to demonstrate that the use of phytanyl aliphatic chains, on the latest generation arsenolipids, allowed the formation of reverse hexagonal phases, a supramolecular organization known to destabilize endocytosis vesicles and thus to promote cytosolic delivery of nucleic acids. Compared to its analogues, this new compound was particularly effective and not very toxic *in vitro* but also in mice, where a higher and more sustained expression of the transgene was observed in pulmonary epithelial cells after intravenous (IV) administration.

We also investigated the various physiological damages caused by systemic administration of lipoplexes. We also used a plasmid optimized to allow sustained expression of the transgene. Acute inflammatory responses as well as a hepatic cytolysis were systematically observed in the first days after administration of the complexes, regardless of the presence of CG immunostimulatory motifs on the plasmid, the duration of transgene expression, or even the nature of the lipid. These phenomena last only a few days, while transgene could be expressed for more than 40 days using the codon-optimized plasmid. Efficient re-administration of lipoplexes was possible, but required sufficient time between each injection, emphasizing the importance of using nucleic acid constructs that give strong and stable transgene expressions. Intratracheal administration of judiciously prepared complexes also showed transgene expression kinetics (bioluminescence) of more than 100 days after a single administration. These results mark real progress in the structural optimization of vectors developed by our group as well as in their formulation, and encourage us to further exploit their potential for the transfer of genes to the lung.