



HAL
open science

Synthèse de nanoparticules monoplasmidiques pour le transfert de gènes

Gwendoline Delecourt

► **To cite this version:**

Gwendoline Delecourt. Synthèse de nanoparticules monoplasmidiques pour le transfert de gènes. Matière Molle [cond-mat.soft]. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS002 . tel-03937009

HAL Id: tel-03937009

<https://theses.hal.science/tel-03937009v1>

Submitted on 13 Jan 2023

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.

Thèse de doctorat de Sorbonne Université

Ecole doctorale 397 - Physique et Chimie des matériaux

Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM – UMR 8232) – Equipe Chimie des Polymères

Synthèse de nanoparticules monoplasmidiques pour le transfert de gènes

Présentée par

Gwendoline DELECOURT

Pour obtenir le grade de

Docteur de Sorbonne Université

Spécialité : Physique et Chimie des Matériaux

Dirigée par Dr Véronique Bennevault et Pr Philippe Guégan

Présentée et soutenue publiquement le 11 janvier 2021 devant un jury composé de :

M. Jean-Luc SIX	PR – Université de Lorraine	Rapporteur
M. Patrice Woisel	PR – Université de Lille	Rapporteur
Mme. Christine MENAGER	PR – Sorbonne Université	Examinatrice
M. Julien NICOLAS	DR – Université Paris-Saclay	Examinateur
M. Patrick MIDOUX	DR – CBM Orléans	Membre invité
Mme. Véronique BENNEVAULT	MC – Sorbonne Université	Directrice de thèse
M. Philippe GUEGAN	PR – Sorbonne Université	Co-Directeur de thèse



*A Andrée et Albert,
A Sabine et Jacques,
Mes grands-parents,*

*« Une personne qui n'a jamais commis d'erreurs
n'a jamais tenté d'innover »*

Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Ce travail réalisé à l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire au sein de l'équipe Chimie des Polymères, dirigée par le Dr Laurent Bouteiller, n'aurait pas été possible sans les nombreuses personnes qui, tout au long de ces trois années, m'ont permis de mener à bien ce projet en me soutenant professionnellement et personnellement.

Je tiens tout d'abord à remercier les différents membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail de thèse : Pr. Jean-Luc Six et Pr. Patrice Woisel qui ont accepté de rapporter ce travail et Pr. Christine Ménager et Dr. Julien Nicolas qui ont accepté d'examiner ce travail. Je remercie également le Dr. Patrick Midoux de compléter ce jury en tant que membre invité et de me faire bénéficier de ces connaissances dans ce domaine. Dans un second temps, je souhaiterais remercier le Pr. Thibaud Coradin, le Dr. Géraldine Rohman et le Dr. Lydia Sosa-Varga pour le temps qu'ils m'ont accordé lors des deux comités de suivi de thèse ainsi que pour leurs conseils pour faire avancer le projet.

Je remercie très chaleureusement mes directeurs de thèse, le Dr. Véronique Bennevault et le Pr. Philippe Guégan. Merci à vous de m'avoir accordé votre confiance il y a trois ans quand je suis venue frapper à votre porte suite aux résultats de l'ANR. Merci Véronique pour ta patience, ta disponibilité et ta rigueur. Tu m'as apporté les connaissances nécessaires tout au long de ces trois ans tout en me laissant m'épanouir dans ce projet. Je te remercie également pour ton écoute et toutes les discussions non-scientifiques que nous avons pu avoir qui permettent de travailler dans une atmosphère agréable. Philippe, je vous remercie pour votre confiance et vos conseils qui m'ont permis de prendre confiance en moi et de me poser les bonnes questions (même s'il en restera toujours !) tant sur le plan expérimental que sur le plan personnel. Je vous remercie pour votre motivation communicative qui nous pousse toujours plus loin et qui permet à l'équipe d'avancer.

J'ai également passé quelques semaines de ces trois années au sein de l'équipe Biologie Cellulaire, Cibles Moléculaires et Thérapies Innovantes du Centre de Biophysique Moléculaire dirigée par le Pr. Chantal Pichon à Orléans. Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Patrick Midoux pour son accueil au sein de l'équipe ainsi que pour le temps qu'il m'a accordé lors des tests de cultures cellulaires. Merci à toute l'équipe qui m'a accueillie le temps de mon séjour parmi eux et notamment Tom à qui j'ai posé énormément de questions et qui m'a formée tout au long des expériences de biologie. Je remercie également Christophe pour les après-midis en salle de DLS et pour les bons moments passés au congrès CNano-SFNano 2019.

Je tiens, également, à remercier les personnes des plateformes techniques qui m'ont aidée dans la caractérisation de mes polymères : Gaëlle pour son expertise en CES, Claire et Aurélie, gardiennes de la plateforme RMN. Je remercie également le Dr. Guillaume Tresset, qui m'a accueillie dans son laboratoire à Orsay pour l'analyse par cryo-TEM de mes polyplexes. Enfin, je remercie le Dr. Vincent Corcé pour la synthèse du Galactose et l'équipe du Pr. Tristan Montier pour les analyses de biologies effectuées sur mes composés.

Ces trois années n'auraient pas été aussi agréables sans l'ambiance générale de l'équipe Chimie des Polymères. Ainsi, j'adresse un grand merci à toutes les personnes de l'équipe qui ont contribué à cette bonne entente au sein du laboratoire. Les pauses cafés, les journées du labo (plus ou moins sportives), les afterwork sans oublier le cake club font partie intégrante de cette expérience qu'est la thèse. Merci à l'équipe PG (ou plutôt la famille PG) –Véronique, Philippe, Nicolas, Cécile, Laetitia, Valentin, Pauline, Léa, Haiqin, Özgül, Dihia, Fernando et Simon – pour les discussions scientifiques des réunions d'équipe (toujours avec le goûter bien sûr !) ainsi que pour nos moments de détente (on ne compte plus nos déjeuners d'équipe dans les restaurants du 5^{ème} arrondissement). Merci à Nicolas pour les blagues et pièges tout au long de ces trois ans qui nous mettent toujours de bonne humeur mais également pour tes conseils avisés lorsque l'on te demande ton avis scientifique. Je remercie également Cécile pour m'avoir écoutée et remonté le moral dans les jours plus difficiles. Enfin, j'adresse mes remerciements aux différents stagiaires qui ont apporté leur aide sur ce projet : Anne, Lise, Angéline et Sarra.

Merci également à tous les doctorants de l'équipe Polymères avec qui j'ai passé de bons moments : Léo et Julien pour nous avoir fait rire à la pause déjeuner, Laura pour son entrain communicatif et son grand sourire. Merci à la famille Tuche, ces « collègues » un peu particuliers : Valentin pour les moments de grande chanson française au laboratoire, Laetitia pour ta « positive attitude » sans faille, Gaëlle pour ta motivation et ton souci du détail et Pauline pour ton sourire et ta joie communicative. On saura conserver cette amitié au-delà de la thèse j'en suis convaincue. Je n'oublie pas la petite nouvelle de l'équipe, Pauline LB : merci à toi pour ta bonne humeur quotidienne.

Enfin, merci à mes amis et à ma famille. Je commencerai par mes parents, Vincent et Isabelle, et mon frère Florian qui m'ont toujours suivie et soutenue dans mes choix d'études (et qui étaient présents pour chaque déménagement !). Je n'oublie pas Clément G, Clément V, Louise, Gauthier, Delphine, Florian et Justine, les amis de Chimie Rennes, qui m'ont permis de m'évader lors de nos week-ends et vacances à travers la France et l'Europe. Merci à vous pour votre soutien et votre écoute. Enfin, j'ajouterai une pensée particulière pour Yan.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2,5-DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid
AAV	Virus adéno-associé / <i>adeno associated virus</i>
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide desoxyribonucléique
ADN_p	Acide desoxyribonucléique plasmidique
AEA	2-aminoethylacrylate
AEM/EMA	Agence européenne des médicaments / <i>european medicine agency</i>
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament
ARN_m	Acide ribonucléique messager
bp	Paire de bases
bPEI	Polyéthylènimine branchée
CES / SEC	Chromatographie d'exclusion stérique / <i>steric exclusion chromatography</i>
CHCA	Acide α -cyanohydroxycinnamique / <i>α-cyanohydroxycinnamic acid</i>
CME	Endocytose clathrine dépendante / <i>clathrin mediated endocytosis</i>
CMV	Cytomégalovirus
cPEI	Polyéthylènimine cyclique
CROP	Polymérisation cationique à ouverture de cycle / <i>cationic ring opening polymerization</i>
Cryo-MET / Cryo-TEM	Cryo-microscopie électronique à transmission / <i>cryogenic transmission electron microscopy</i>
CvME	Endocytose cavéoline dépendante / <i>caveolae mediated endocytosis</i>
D	Dispersité en masses molaires
Da	Dalton, unité de masse atomique définie comme 1/12 de la masse d'un atome de ¹² C, utilisée en biochimie. 1 kDa \approx 1 kg/mol-1
D_H	Diamètre hydrodynamique
DLS	Diffusion dynamique de la lumière / <i>dynamic light scattering</i>
DMAEA	(diméthylamino)éthylacrylate
DMF	Diméthylformamide
DMPA	2,2-Diméthoxy-2-phénylacétophénone

DOGS	Dioléyl-phosphatidyléthanolamine
DOPE	Diocetadecylamidoglycylspermine
DOTMA	Chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium
EtOx	2-éthyl-2-oxazoline
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux / <i>food and drug administration</i>
GTMP	Médicament de thérapie génique / <i>gene therapy medicine product</i>
HNA	L-histidine-N-acryloyl
IC₅₀	Concentration inhibitrice médiane
iPrOx	2-isopropyl-2-oxazoline
IUPAC	Union internationale de chimie pure et appliquée / <i>international union of pure and applied chemistry</i>
LCST	Température de solution critique inférieure / <i>lower critical solution temperature</i>
/PEI	Polyéthylènimine linéaire
MALDI-TOF	Désorption-ionisation laser assistée par matrice - temps de vol / <i>matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight</i>
MeOx	2-méthyl-2-oxazoline
MM	Masse molaire
M_n	Masse molaire moyenne en nombre
MTG	Médicament de thérapie génique
M_w	Masse molaire moyenne en poids
N/P	Ratio molaire amines du polymère/phosphates de l'ADN
NIH	Institut américain de la santé / <i>national institute of health</i>
NLS	Signal de localisation nucléaire / <i>nuclear localization signals</i>
Ox	2-oxazoline
P4Vim	Poly(4-vinylimidazole)
PAA	Polyallylamine
PDI	Indice de polydispersité
PEG	Polyéthylèneglycol
PEI	Polyéthylènimine
PEtOx	Poly(2-éthyl-2-oxazoline)

Phis	Polyhistidine
PiPrOx	Poly(2-isopropyl-2-oxazoline)
PLL	Poly(L-lysine)
PMA	Polyméthacrylate
PMeOx	Poly(2-méthyl-2-oxazoline)
PnPrOx	Poly(2- <i>n</i> -propyl-2-oxazoline)
POx	Poly(2-oxazoline)
PVAm	Polyvinylamine
RAC	<i>Recombinant DNA advisory committee</i>
RI	Indice de réfraction / <i>refractive index</i>
RLU	Unité de lumière relative / <i>relative light units</i>
RMN / NMR	Résonance magnétique nucléaire / <i>nuclear magnetic resonance</i>
siRNA	Petit acide ribonucléique interférent / <i>small interfering acide ribonucleic</i>
SPION	Nanoparticules d'oxide de fer superparamagnétique / <i>superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i>
TAE	Tris, Acide acétique, Éthylènediaminetétraacétique (Tampon pour électrophorèse)
UCST	Température de solution critique supérieure / <i>Upper critical solution temperature</i>
WR	Ratio massique polymère / ADN / <i>Weight ratio polymer/DNA</i>
X_n	Degré de polymérisation moyen en nombre

GLOSSAIRE

ADN plasmidique (ADN_p)

L'ADN_p est un ADN double brin de grande taille qui contient, en plus de la séquence codante du gène et le promoteur, des séquences permettant sa réplication autonome et des gènes de résistance à des antibiotiques nécessaires à sa production par les bactéries

Bioluminescence

Photons émis par une source biologique

Charger

Dans le cadre des expériences de retard sur gel d'agarose, signifie introduire dans les puits les produits d'intérêt

Condensation

Réduction du volume occupé par l'ADN

Endothélium

Couche de cellules épithéliales qui tapisse l'intérieur des parois du cœur et des vaisseaux

ex vivo

Du latin « à l'extérieur du vivant », caractérise des tests biologiques menés sur des cellules hors de l'organisme dont elles proviennent

Furtivité

Capacité d'une nanoparticule à échapper au système immunitaire et ainsi à prolonger son temps de circulation dans le sang

Hépatocyte

Cellule du foie

Homéostasie

Stabilisation, régulation chez les organismes vivants, de certaines caractéristiques physiologiques (pression artérielle, température, etc.)

in vitro

Du latin « sous verre », caractérise des tests menés sur des micro-organismes, organes ou cellules en dehors de leur contexte naturel

in vivo

Du latin « à l'intérieur du vivant », caractérise des tests menés sur des organismes vivants

Lumière d'un endosome

Compartiment interne de l'endosome

Prévalence

La prévalence est le nombre de personnes atteintes de cette maladie à un instant donné sur une population donnée

Quiescente

Ce dit d'une cellule en non division

SOMMAIRE

Remerciements	i
Liste des abréviations	iii
Glossaire	vii
Liste des figures	xviii
Liste des schemas.....	xxiii
Liste des tableaux	xxvi
Introduction générale.....	1

CHAPITRE 1

Etude bibliographique

Introduction	15
Partie I.La thérapie génique	17
I. Un peu d'histoire	18
I.1. Les prémices de la thérapie génique	18
I.2. Aujourd'hui : Où en sommes-nous ?	19
II. Le fonctionnement de la thérapie génique	23
II.1. Les différentes approches	23
II.2. Les étapes de la transfection d'un exogène	24
II.2.a. La formation du polyplexe	25
II.2.b. L' administration	26
II.2.c. Le transport extracellulaire	26
II.2.d. L'internalisation cellulaire.....	29
II.2.e. La sortie de l'endosome	32
II.2.f. Le trafic intracellulaire et l'internalisation dans le noyau	33
III. Les méthodes de transfection	34
III.1. Les méthodes physiques	34
III.2. Les vecteurs viraux	35
III.3. Les vecteurs non-viraux	37
III.3.a. Les vecteurs lipidiques	37
III.3.b. Les vecteurs polymériques	39
III.3.b.i. La poly(L-lysine)	40
III.3.b.ii. La polyéthylènimine	41
III.3.b.iii. La polyallylamine	41
III.3.b.iv. La polyvinylamine	42
III.3.b.v. Les poly-L-histidine et polyvinylimidazole	42
III.3.b.vi. Les dérivés de polyacrylate et polyméthacrylate	43

III.3.b.vii. Les polysaccharides	43
Partie II. Les vecteurs PEI et les stratégies d'amélioration	45
I. La PEI : polymère de référence en thérapie génique non-virale	45
I.1. Ses caractéristiques	45
I.2. Les stratégies de synthèse	46
I.2.a. La CROP de l'aziridine	46
I.2.b. La CROP de 2-alkyl-2-oxazoline et leur hydrolyse	47
I.2.b.i. La synthèse des poly(2-oxazoline)s	47
I.2.b.ii. L'hydrolyse des poly(2-oxazoline)s	50
I.3. Son utilisation en thérapie génique	51
I.3.a. Le mécanisme d'internalisation des polyplexes à base de /PEI	51
I.3.b. L'efficacité de transfection des PEI	51
I.3.c. La toxicité des PEI	52
II. Les stratégies d'amélioration du transfert de gènes par la PEI et leur apport	53
II.1. Les différentes stratégies	53
II.1.a. Les sites de greffage possibles	53
II.1.b. Les méthodes de greffage	54
II.1.b.i. Les méthodes avec monomères fonctionnels et « grafting from »	55
II.1.b.ii. La méthode « grafting onto »	55
II.1.c. Les réactions de couplage	55
II.2. Les molécules d'intérêt	56
II.2.a. Les ligands de ciblage cellulaire	56
II.2.b. Les fonctionnalisations spécifiques du transfert de gènes	59
II.2.b.i. L'échappement de l'endosome	59
II.2.b.ii. La toxicité des vecteurs	60
II.2.b.iii. Le transport dans le cytosol	61
II.2.b.iv. L'entrée dans le noyau	61
II.2.c. Les modifications permettant un diagnostic	61
II.2.c.i. Les fluorophores organiques	62
II.2.c.ii. Les particules inorganiques	63
II.3. La PEGylation	64
II.3.a. Le principe de la PEGylation	64
II.3.b. La PEGylation en transfert de gènes	64
II.3.c. Les limites de la PEGylation	67
II.3.d. Les alternatives à la PEGylation	67
Partie III. Les copolymères PEI-POx	69
I. La POxylation <i>versus</i> la PEGylation	69
II. Les méthodes de synthèse	70
II.1. La méthode « couplage »	70

II.2. L'hydrolyse de polyoxazolines	71
III. Les copolymères PEI-POx en thérapie génique	71
III.1. Les copolymères statistiques	71
III.2. Les copolymères à blocs double hydrophiles PEI- <i>b</i> -POx	72
Partie IV. La physicochimie des complexes ADN-Polymère	75
I. La formation du complexe.....	75
I.1. Les polyélectrolytes	75
I.1.a. L'ADN, polyanion fort	75
I.1.b. La polyéthylèneimine, polycation faible	76
I.2. La complexation	77
I.3. Méthode de formulation	79
II. Les contraintes des tests biologiques	81
II.1. <i>In vitro</i>	81
II.2. <i>In vivo</i>	82
Conclusion	84
L'objectif de la thèse	85
Références	86

CHAPITRE 2

Synthèse de copolymères à blocs doubles hydrophiles poly(2-oxazoline-*b*-éthylènimine)

Introduction	107
Partie I. Synthèse des copolymères à blocs poly(2-oxazolines)s	109
I. Synthèse d'homopolymères poly(2-oxazoline)s	110
I.1. Synthèse d'homopolymères poly(2-méthyl-2-oxazoline)s	110
I.2.a. Synthèse de PMeOx de différentes masses molaires	110
I.2.a. Comparaison du chauffage conventionnel et micro-ondes	115
I.2. Synthèse d'homopolymères poly(2-éthyl-2-oxazoline)s	116
I.3. Synthèse d'homopolymères poly(2-isopropyl-2-oxazoline)s	119
II. Synthèse de copolymères poly(2-oxazoline)s	122
II.1. Synthèse des copolymères poly(2-méthyl-2-oxazoline)- <i>b</i> -(2-éthyl-2-oxazoline)s	122
II.2. Synthèse des copolymères poly(2-isopropyl-2-oxazoline)- <i>b</i> -(2-méthyl-2-oxazoline)s	126
Partie II. Synthèse des copolymères à blocs PEI-<i>b</i>-POx	132
I. Hydrolyse des homopolymères	132
I.1. Hydrolyse des homopolymères témoins des PMeOx- <i>b</i> -PEtOx	132
I.2. Hydrolyse des homopolymères PMeOx témoins des PiPrOx- <i>b</i> -PMeOx	134
II. Hydrolyse des copolymères poly(2-méthyl-2-oxazoline)- <i>b</i> -(2-éthyl-2-oxazoline)s	138
II.1. Thermosensibilité des copolymères PMeOx- <i>b</i> -PEtOx	138
II.2. Hydrolyse basique ou acide des copolymères PMeOx- <i>b</i> -PEtOx	139
III. Hydrolyse des copolymères poly(2-isopropyl-2-oxazoline)- <i>b</i> -(2-méthyl-2-oxazoline)s	143
III.1. Thermosensibilité des copolymères PiPrOx- <i>b</i> -PMeOx	143
III.2. Hydrolyse acide des copolymères PiPrOx- <i>b</i> -PMeOx	143
Conclusion	149
Références	151
Annexes	153

CHAPITRE 3

Fonctionnalisation des vecteurs PEI et PiPrOx-*b*-PEI

Introduction	167
Partie I. Fonctionnalisation des motifs éthylènimine	169
I. Synthèse de la L-histidine-N-acryloyle (HNA)	169
II. Modification des polymères à base de PEI par la HNA	172
II.1. Fonctionnalisation des <i>l</i> PEI	172
II.2. Fonctionnalisation des PEI- <i>b</i> -PiPrOx	175
II.2.a. Etude du pH	177
II.2.b. Etude en température	177
II.2.c. Etude du solvant	179
Partie II. Fonctionnalisation des extrémités de chaîne	181
I. Fonctionnalisation par le galactose	181
I.1. Modification de la PiPrOx	183
I.2. Modification des PiPrOx- <i>b</i> -PEI	187
II. Fonctionnalisation par le dansyle	189
II.1. Synthèse de polymères fluorescents	190
II.1. Caractérisation des polymères fluorescents par spectroscopie	197
II.1.a. Spectroscopie UV des polymères	197
II.1.b. Spectroscopie de fluorescence des polymères	198
Conclusion	200
Références	201
Annexes	203

CHAPITRE 4

Formulation, caractérisation et activité biologique des polyplexes à partir des PEI et des PiPrOx-b-PEI

Introduction	215
Partie I. Formulation des polyplexes	219
I. Formulation classique	220
I.1. Principe	220
I.2. Résultats 2	21
II. Formulation par extrusion	222
II.1. Principe	223
II.2. Etudes préliminaires	224
II.2.a. Quantification de la concentration en ADN p	224
II.2.b. Intégrité de la molécule d'ADN p	225
II.2.c. Evaluation de la reproductibilité	225
II.2.d. Comparaison à une formulation classique	226
II.3. Paramétrage de l'extrusion	228
II.3.a. Diamètre des pores de la membrane	228
II.3.b. Pression de l'extrusion	229
II.4. Influence du vecteur	231
II.4.a. Masse molaire du polymère	231
II.4.b. Architecture des polymères	234
II.4.c. Rapport massique polymère/ADN p	236
II.4.d. pH	239
II.5. Cryo-TEM	241
II.6. Bilan des conditions expérimentales de l'extrusion	243
Partie II. Evaluation biologique des polyplexes	247
I. Tests <i>in vitro</i>	248
I.1. Etude des polyplexes de PEI- <i>b</i> -POx et lPEI témoins	248
I.1.a. Formulation classique des polyplexes	248
I.1.b. Electrophorèse sur gel d'agarose des formulations	248
I.1.b.i. Principe	248
I.1.b.ii. Analyses des formulations classiques à partir des PEI- <i>b</i> -PiPrOx et PEI témoins	250
I.1.c. Taille et potentiel zêta des polyplexes	252
I.1.d. Stabilité des polyplexes	255
I.1.d.i. Principe	255
I.1.d.ii. Analyses des polyplexes de PEI- <i>b</i> -PiPrOx et de lPEI	257
I.1.e. Tests de cytotoxicité (MTT)	260

I.1.e.i. Principe	260
I.1.e.ii. Analyses des polymères	261
I.1.f. Tests de transfection (Test RLU)	263
I.1.f.i. Principe	263
I.1.f.ii. Résultats	263
I.2. Apport de la fonctionnalisation de lPEI et de PEI- <i>b</i> -PiPrOx par des greffons histidine ou galactose	265
I.2.a. Electrophorèse sur gel d'agarose	266
I.2.b. Tests de cytotoxicité	267
I.2.c. Tests de transfection	268
I.3. Comparaison formulation classique/extrusion.....	270
I.3.a. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	271
I.3.b. Tests de transfection	272
II. Tests <i>in vivo</i>	274
II.1. Formulation des polyplexes par extrusion	275
II.2. Evaluation biologique des polyplexes sur souris	279
II.2.a. Mode d'administration	279
II.2.b. Principe.....	279
II.2.c. Résultats	280
Conclusion	286
Références	288
Annexes	291

CHAPITRE 5

Techniques expérimentales

Part I. Instrumentation	301
I. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	301
II. Size Exclusion Chromatography (SEC)	302
II.1. SEC in DMF	302
II.2. SEC in water	302
III. Dynamic Light Scattering (DLS)	302
IV. Mass spectrometry	303
IV.1. Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF)	303
IV.2. High Resolution Mass Spectrometry (HRMS-ESI)	303
V. Nano DSC differential scanning calorimeter	304
VI. Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM)	304
Part II. Synthetic procedures	304
I. Reagents	304
II. Dialysis	305
III. Poly(2-oxazoline)s synthesis	306
III.1. Homopoly(2-oxazoline)s	306
III.2. PMeOx- <i>b</i> -PEtOx copolymers	306
III.3. PiPrOx- <i>b</i> -PMeOx copolymers	307
IV. Poly(ethylenimine) synthesis	308
IV.1. Homopolymers of poly(ethylenimine).....	308
IV.1.a. Basic hydrolysis	308
IV.1.b. Acidic hydrolysis	308
IV.2. POx- <i>b</i> -PEI copolymers	308
IV.2.a. Basic hydrolysis	308
IV.2.b. Acidic hydrolysis	309
V. Polymers post-functionalization	309
V.1. Histidine grafting	309
V.1.a. Synthesis of HNA	308
V.1.b. HNA grafting onto polymers	310
V.2. Galactose grafting	311
V.2.a. Synthesis of the 3-mercaptopropyl- β -D-galactopyranoside	311
V.2.b. Galactose grafting onto polymers	313
Part III. Biological protocol	314

I. Materials	314
I.1. Plasmids	314
I.2. Reagent and buffer	314
I.3. Cells	314
II. Polyplexes formulation	314
II.1. Standard method	314
II.2. Extrusion method	315
III. Size and zeta potential evaluation of polyplexes	315
IV. Electrophoretic mobility shift assays	316
V. Transfection efficiency of polyplexes	316
VI. Cytotoxicity of polymers	316
VII. <i>In vivo</i> experiment	317
References	318
Conclusion générale.....	321

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Répartitions des essais cliniques de thérapie génique selon (a) les maladies traitées et (b) le type de vecteurs utilisé. Adapté de ¹⁶	20
Figure I.2 : (a) Schéma réactionnel de la synthèse des PEI-FA et (b) expression de la luciférase des polyplexes PEI-FAX/pLUCI à différents ratios massiques dans les cellules KB avec les témoins 1,8K PEI/pLUCI et 25k PEI/pLUCI (à leur rapport massique optimal). Adapté de ¹⁶⁴	59
Figure I.3 : (a) Structure des PEG-PEI synthétisés, (b) tailles des complexes formés et (c) efficacité de transfection des complexes en fonction du polymère et du ratio N/P utilisés. (PEG-PEI(X-P-Q) : X = masse molaire en kDa du bloc PEG, P = masse molaire en kDa du bloc PEI, Q = taux de greffage de PEG avec 1 = 1/9, 2 = 1/3, 3 = 1/1).....	65
Figure I.4 : Constante ionique apparente pK_b et pH en fonction du degré d'ionisation pour une solution aqueuse de PEI à 1 % massique. Extrait de ²²²	77
Figure I.5 : (a) Mobilité électrophorétique et (b) rayon hydrodynamique en fonction du rapport de charges x (concentration en ADN c = 0,01% (w/v), force ionique [I] = 0,15 M et pH = 7,4. Complexes ADN/IPEI 2,5 kDa (□) et ADN/IPEI 25 kDa (•) ; Extrait de ²²⁹). (c) Représentation schématique des structures obtenues en fonction du rapport x. Adapté de ²²⁷	80
Figure II.1 : LCST de différents poly(2-alkyl-2-oxzoline)s dans l'eau.....	109
Figure II.2 : Spectre RMN ¹ H du polymère GwD-04 dans du CDCl ₃ à 20 °C.....	112
Figure II.3 : Chromatogrammes (a) par CES DMF des polymères PMeOx et (b) par CES aqueuse du polymère GwD-14.....	113
Figure II.4 : (a) Spectre MALDI-TOF du polymère GwD-04 en mode réflectron et (b) zoom sur la zone 3550 – 3750 m/z.....	114
Figure II.5 : Spectre RMN ¹ H du polymère GwD-49 dans du CDCl ₃ à 20 °C.....	117
Figure II.6 : (a) Spectre MALDI-TOF du polymère GwD-15 en mode réflectron et (b) zoom sur la zone 2000 – 2200 m/z.....	118
Figure II.7 : Spectre RMN ¹ H du polymère GwD-72 purifié dans du D ₂ O à 20 °C.....	120
Figure II.8 : Chromatogrammes des polymères GwD-67 et GwD-72 par CES DMF.....	121
Figure II.9 : (a) Spectre MALDI-TOF du polymère GwD-72 en mode réflectron et (b) zoom sur la zone 5450 – 5750 m/z.....	121
Figure II.10 : Spectre RMN ¹ H de P ₁ dans le CDCl ₃ à 20 °C.....	124
Figure II.11 : Chromatogrammes obtenus par SEC DMF des copolymères (a) P ₁ , (b) P ₂ et (c) P ₃ avec les prélèvements P ₂ -PMeOx et P ₃ -PMeOx.....	125
Figure II.12 : Chromatogrammes obtenus par CES aqueuse des copolymères (a) P ₂ et (b) P ₃	125
Figure II.13 : Chromatogrammes obtenus par CES DMF du polymère P ₄ dialysé contre l'acétonitrile (D1) et dialysé contre d'eau (D2).	126

Figure II.14 : $\ln I$ versus $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ pour les protons méthyle des unités iPrOx situés entre 1,21 et 1,03 ppm (γ : rapport gyromagnétique, g : intensité du gradient de champ, δ : durée du gradient, Δ : temps entre 2 pulses de gradient) ; copolymère (P ₄).	127
Figure II.15 : Spectre RMN ¹ H du copolymère P ₆ dans D ₂ O à 20 °C.	129
Figure II.16 : Chromatogrammes du copolymère P ₆ et du prélèvement PiPrOx obtenus par CES (a) DMF et (b) aqueuse.	130
Figure II.17 : Spectre RMN DOSY du copolymère P ₆ dans D ₂ O à 25°C.	131
Figure II.18 : $\ln I$ versus $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ pour les protons méthyle des unités iPrOx situés entre 1,21 et 1,03 ppm ; copolymère (P ₆).	131
Figure II.19 : Spectre RMN ¹ H de GwD-05 dans MeOD à 20 °C.	133
Figure II.20 : Spectre RMN ¹ H du polymère GwD-137 dans D ₂ O.	135
Figure II.21 : Spectres RMN HSQC des polymères (a) GwD-133 et (b) GwD-137 dans D ₂ O.	137
Figure II.22 : Analyse par nano-DSC des copolymères P ₂ et P ₃ avec [unités Ox] = 0,48 M dans l'eau. Rampe de 5°C à 130 °C, vitesse 1 °C.min ⁻¹	139
Figure II.23 : Superposition des spectres RMN ¹ H du copolymère P ₃ hydrolysé à différents temps de réaction (réaction H _{P3-3}).	141
Figure II.24 : (a) Cinétique d'hydrolyse de la réaction H _{P3-3} et (b) rapport d'hydrolyses MeOx/EtOx en fonction du degré d'hydrolyse de MeOx.	142
Figure II.25 : Analyse par nano-DSC du copolymère PiPrOx- <i>b</i> -P ₆ avec [unités Ox] = 0,48 M dans l'eau. Rampe de 5°C à 100 °C, vitesse 1 °C.min ⁻¹	143
Figure II.26 : Superposition des spectres RMN ¹ H du copolymère P ₆ hydrolysé à différents temps de réaction (réaction H _{P6}).	144
Figure II.27 : Cinétique d'hydrolyse de la réaction H _{P6} (Expérience 1 de 0 à 10 h (●;●;●), expérience 2 de 10 h à 14 h (▲;▲;▲), expérience 3 de 14 h à 16,5 h (■;■;■)).	145
Figure II.28 : Tailles des objets mesurées par DLS en intensité et en nombre pour P ₆ à 70 °C dans de l'éthanol ou dans un mélange EtOH/H ₂ O 80/20 v/v + HCl.	146
Figure II.29 : Température d'agrégation de H _{P6} en fonction du temps d'hydrolyse ([unité Ox] = 0,48 M ; taux d'hydrolyse en MeOx obtenu après 3h20, 6h40 et 10h : 27,7 %, 57,3 % et 78,1 %).	147
Figure II.30 : Spectre RMN DOSY du copolymère P ₆ hydrolysé (temps d'hydrolyse = 8h40) dans D ₂ O à 25°C.	148
Figure III.1 : Spectres RMN ¹ H de (a) la L-histidine et (b) de la HNA dans D ₂ O à 20 °C.	170
Figure III.2 : Spectre RMN ¹ H du polymère T _{HP6-his} (GwD-154) dans D ₂ O à 20 °C.	174
Figure III.3 : Spectre RMN ¹ H du copolymère GwD-92 modifié par la HNA.	176
Figure III.4 : Mesure de la taille des objets par DLS en nombre pour SAK-2 en solution dans l'eau à 20 °C.	177

Figure III.5 : Etude en température par DLS d'une solution aqueuse du copolymère H _{P6} , SAK-2 ([EI] = 0,48 M). Rampe de 20 à 65 °C, pH 7.	178
Figure III.6 : Fonctionnalisation de l'alcyne terminale par deux molécules de galactose sur (a) un homopolymère PiPrOx modèle et sur (b) un copolymère PiPrOx- <i>b</i> -PEI.	183
Figure III.7 : Spectre RMN de GwD-128 dans D ₂ O à 20 °C (l'attribution du spectre est faite en portant des chiffres en orange pour les protons spécifiques aux chaînes PiPrOx non fonctionnalisées, en vert pour les protons spécifiques aux chaînes fonctionnalisées et en noir pour les protons communs aux 2 types de chaînes).	185
Figure III.8 : Spectre RMN HSQCed du copolymère GwD-128 dans D ₂ O à 20 °C.....	186
Figure III.9 : Chromatogramme par CES DMF du polymère GwD-128.	187
Figure III.10 : Structure du chlorure de dansyle (Ds-Cl) et du dansyle amide (Ds-NH ₂). ..	189
Figure III.11 : (a) Spectre RMN ¹ H de GwD-17 après précipitation ; Chromatogrammes RI et UV à 254 nm par CES DMF de (b) GwD-17 brut et (c) GwD-17 précipité.....	191
Figure III.12 : Spectre RMN ¹ H de GwD-166 dans le CDCl ₃ à 20 °C.....	192
Figure III.13 : (a) Chromatogrammes UV et RI par CES DMF de GwD-28-D2 et (b) chromatogrammes UV par CES DMF des polymères GwD-109-D2 et GwD-28-D2 (UV = 254 nm).	193
Figure III.14 : Chromatogrammes (a) RI et (b) UV par CES DMF du polymère GwD-28 à différentes étapes de purification (b = brut, D1 = dialyse 1 dans l'eau, D2 = dialyse 2 dans le méthanol).....	194
Figure III.15 : HRMS-ESI du 1er lot de chlorure de dansyle à 10 µg.mL ⁻¹ dans CH ₃ CN (en haut : spectre expérimental ; en bas = spectre théorique ; erreur = 0 ppm).	195
Figure III.16 : (a) Spectre Maldi-TOF du polymère GwD-166 en mode réflectron et (b) zoom sur la zone 1100 – 1230 m/z.....	196
Figure III.17 : (a) Structure du chlorure de dansyle, du dansyle amide et d'une poly(2-méthyl-2-oxazoline) amorcée par du chlorure de dansyle et (b) spectres UV des molécules dansyle, d'un polymère amorcé par le dansyle (Ds-PMeOx) et d'un polymère non fluorescent (PMeOx) (λ _{ex} = 337 nm, C = 1,7.10 ⁻⁷ mol.L ⁻¹).	197
Figure III.18 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction (a) de la concentration en DsCl et Ds-PMeOx avec λ _{ex} = 324 nm et λ _{em} = 441 nm et (b) de la concentration en DsNH ₂ et Ds-PMeOx avec λ _{ex} = 333 nm et λ _{em} = 505 nm.	198
Figure VI.1 : Structure du plasmide <i>p</i> TG11033.	220
Figure IV.2 : Système d'extrusion utilisé pour les formulations : (a) photo de l'extrudeuse et (b) schéma.	223
Figure IV.3 : Diamètres hydrodynamiques des polyplexes en intensité et en nombre obtenus par DLS en fonction du diamètre des pores de la membrane (<i>M</i> _n PEI = 10 kDa, Solvent : Hepes 10 mM). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.	229

Figure IV.4 : Diamètres hydrodynamiques des polyplexes en intensité et en nombre obtenus par DLS en fonction de la pression d'extrusion (M_n polymère = 10 kDa, Solvant : Hepes 10 mM). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation	230
Figure IV.5 : Diamètres hydrodynamiques des polyplexes en intensité et en nombre obtenus par DLS en fonction de la masse molaire de la PEI (Solvant : Hepes 10 mM). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.....	233
Figure IV.6 : Structures supposées des complexes formés à partir des divers polymères fonctionnels : (a) avec une PEI linéaire, (b) avec une PEI en étoile à 4 branches, (c) avec un copolymère PEI- <i>b</i> -PiPrOx, (d) avec un copolymère PEI- <i>b</i> -PiPrOx fonctionnalisé par du galactose et (e) avec un polymère <i>l</i> PEI histidinylé..	234
Figure IV.7 : Diamètres hydrodynamiques des polyplexes en intensité et en nombre mesurés par DLS en fonction de l'architecture du polymère (M_n PEI \approx 15 kDa, Solvant : Hepes 10 mM). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.	235
Figure IV.8 : Diamètres hydrodynamiques des polyplexes en intensité et en nombre mesurés par DLS en fonction (a) du ratio massique PEI/ADNp et (b) du ratio massique polymère/ADNp (M_n PEI = 10 kDa, Solvant : Hepes 10 mM). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.....	238
Figure IV.9 : Diamètres hydrodynamiques des polyplexes en intensité et en nombre obtenus par DLS en fonction du pH de la solution de polymère (M_n PEI \approx 15 kDa, Solvant : Hepes 10 mM, analyses à pH 7). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.	240
Figure IV.10 : Images Cryo-TEM des polyplexes à base de (a) <i>l</i> PEI et (b) copolymère PEI- <i>b</i> -PiPrOx obtenus par formulation classique et à base d'un copolymère PEI- <i>b</i> -PiPrOx (c) GwD-F-49 et (d) GwD-F-45 obtenus par extrusion.....	242
Figure IV.11 : Exemple d'électrophorèse des complexes SAK4/ <i>p</i> TG11033 à différents WR (1/1, 3/1 et 6/1) avec une référence de masses molaires en piste 1 et l'ADNp libre, <i>p</i> TG11033, en piste 5.....	249
Figure IV.12 : Electrophorèse sur gel d'agarose des polyplexes préparés à partir des PEI- <i>b</i> -PiPrOx (WR en polymère total et WR en PEI) et des PEI linéaires témoins.	251
Figure IV.13 : Diamètres hydrodynamiques en intensité des polyplexes préparés par formulation classique au WR _{PEI} 3/1 et 6/1. (DLS = Horiba, 25 °C). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.	253
Figure IV.14 : Potentiel zêta des polyplexes préparés par formulation classique à des WR _{PEI} de 3/1 et 6/1. (DLS = Horiba, 25 °C). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.	254
Figure IV.15 : Electrophorèse sur gel d'agarose de polyplexes formulés à partir de PEI- <i>b</i> -PiPrOx, GwD-96, en présence de sulfate de dextrane ([sulfate de dextrane] = 0 à 10 mg.mL ⁻¹).	256
Figure IV.16 : Pourcentage d'ADNp relargué en fonction de la concentration de sulfate de dextrane pour les polymères <i>l</i> PEI aux WR _{PEI} (a) 3/1 et (b) 6/1 et pour les copolymères PEI- <i>b</i> -PiPrOx aux WR _{PEI} (c) 3/1 et (d) 6/1.....	258
Figure IV.17 : Toxicité sur les cellules HepG2 des polymères PEI- <i>b</i> -PiPrOx et <i>l</i> PEI témoins en fonction de la concentration molaire en polymère.	262

Figure IV.18 : Efficacité de transfection des cellules HepG2 par les polyplexes à base de PEI et de PEI- <i>b</i> -PiPrOx à 48 h. ($WR_{PEI} = 3/1$ ou $6/1$; 2,5 mg d'ADN <i>p</i> TG11033 par puits ; PTG1 [®] = <i>l</i> PEI(his), Polythéragène).....	264
Figure IV.19 : Electrophorèse sur gel d'agarose des polyplexes préparés à partir de PEI(his) (GwD-172), de PEI(his)- <i>b</i> -PiPrOx (GwD-146) et de PEI- <i>b</i> -PiPrOx-Galactose (GwD-148). (WR_{PEI} de 1/1 à 8/1, M_n PEI = 15 kDa).....	266
Figure IV.20 : Viabilité des cellules HepG2 en présence des complexes formulés par voie classique à partir des polymères PEI- <i>b</i> -PiPrOx (SAK-4), <i>l</i> PEI(his) (GwD-172), PEI(his)- <i>b</i> -PiPrOx (GwD-146) et PEI- <i>b</i> -PiPrOx-Gal (GwD-148) aux WR_{PEI} 3/1 et 6/1.....	268
Figure IV.21 : Efficacité de transfection des polyplexes à base de PEI(his) (GwD-172), de PEI(his)- <i>b</i> -PiPrOx (GwD-146) et de PEI- <i>b</i> -PiPrOx-Galactose (GwD-148) sur (a) des cellules HeLa et (b) des cellules HepG2 ($WR_{PEI} = 3/1$ ou $6/1$, 1 μ g d'ADN par puits ; PTG1 [®] = <i>l</i> PEI(his), Polythéragène).....	269
Figure IV.22 : Electrophorèse sur gel d'agarose des polyplexes préparés à partir de AF7 (<i>l</i> PEI(his), M_n PEI = 7,6 kDa) par formulation classique aux $WR_{polymer}$ 1/1, 3/1 et 6/1 ou par extrusion à un $WR_{polymer}$ 3/1 (GwD-F-12) (en rose clair et foncé) et à partir de PLL 131 (<i>l</i> PEI(his), M_n PEI = 15,9 kDa) par formulation classique aux $WR_{polymer}$ 1/1, 3/1 et 6/1 ou par extrusion à un $WR_{polymer}$ 3/1 (GwD-F-13) (en violet clair et foncé).....	271
Figure IV.23 : Efficacité de transfection sur cellules HepG2 des polyplexes préparés à partir de <i>l</i> PEI(his) de deux masses molaires (AF7, M_n PEI = 7,6 kDa et PLL131, M_n PEI = 15,9 kDa) par formulation classique ($WR_{polymer}$ 3/1 et 6/1) ou par extrusion ($WR_{polymer}$ 3/1). (2,5 μ g d'ADN par puit, <i>p</i> TG11033).....	273
Figure IV.24 : Bioluminescence de (a) la face antérieure et (b) la face postérieure des souris ayant reçu des polyplexes formulés par extrusion. (200 μ L injectés, [ADN <i>p</i>] = 280 μ g.mL ⁻¹ et 550 μ g.mL ⁻¹) (* : 5 souris décédées, ** : 2 souris décédées).....	285

LISTE DES SCHEMAS

Schéma I.1 : Les différentes approches en thérapie génique : (a) la thérapie d'augmentation génétique, (b) la thérapie d'inhibition génique, (c) la destruction d'un type cellulaire. Extrait de ²⁶	23
Schéma I.2 : Les différentes techniques de thérapie génique : <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> . Extrait de ³¹	24
Schéma I.3 : Les différentes étapes de la transfection : (i) formation d'un complexe ADN/polymère, (ii) administration du traitement, (iii) les différentes barrières biologiques extracellulaires, (iv) endocytose du vecteur, (v) libération du vecteur dans le cytoplasme, (vi) migration dans le cytosol et entrée de l'ADN dans le noyau.	25
Schéma I.4 : Pénétration des gouttelettes aérosolisées dans les poumons selon leur taille. Adapté de ³⁵	27
Schéma I.5 : Distribution du flux sanguin dans les différents organes. Extrait de ³⁶	27
Schéma I.6 : (a) Organisation et (b) schéma des voies d'internalisation cellulaire par endocytose. Adapté de ^{40,41}	30
Schéma I.7 : Mécanisme d'éponge à protons induit par le polyplexe : (a) acidification de l'endosome par les ATPase, (b) entrée de protons H ⁺ et d'ions Cl ⁻ et protonation du polyplexe par effet éponge à protons, (c) arrivées supplémentaires d'ions et de molécules d'eau entraînant la déstabilisation de la membrane.	33
Schéma I.8 : Les différentes structures des lipoplexes : (a) la structure lamellaire L _α , (b) la structure hexagonale H _I ^C , (c) la structure hexagonale inversée H _{II} ^C . Extrait de ⁷⁶	38
Schéma I.9 : Structure de différents lipides utilisés pour le transfert de gènes : (a) le chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTMA), (b) la dioctadecylamidoglycylspermine (DOGS), (c) la dioléyl-phosphatidyléthanolamine (DOPE), (d) le cholestérol.	39
Schéma I.10 : Mécanisme d'échappement de l'endosome : (a) le lipoplexe est encapsulé dans un endosome, (b) les lipides cationiques du lipoplexe interagissent avec les lipides de la membrane endosomale, (c) la fusion des deux membranes permet la libération de l'ADN dans le cytosol. Extrait de ⁷⁹	39
Schéma I.11 : Structures des différents polymères utilisés en thérapie génique : (a) poly(L-lysine), PLL ; (b) polyéthylèneimine, PEI ; (c) Polyallylamine, PAA ; (d) polyvinylamine, PVAm ; (e) polyhistidine, PHis ; (f) poly(4-vinylimidazole), P4VIm ; (g) polyméthacrylate possédant une chaîne pendante aminée, par exemple poly(aminoéthylméthacrylate) PAEMA dans le cas où R = -(CH ₂) ₂ -NH ₂	40
Schéma I.12 : Structures des copolymères statistiques à base de poly(N-méthylvinylamine) synthétisés par Dréan <i>et al.</i> ⁹³	42
Schéma I.13 : Structure de cyclodextrines modifiées : (a) heptakis(6-deoxy-6-pyridylamino)-βCD, (b) hydroxypropyl-βCD(HPCD)-PEI600. ^{103,105}	44
Schéma I.14 : Structures possibles de la polyéthylèneimine : (a) linéaire, (b) branchée, (c) cyclique et (d) en étoile.	45
Schéma I.15 : (a) Synthèse de bPEI par CROP de l'aziridine, (b) le 1-(terahydropyranyl)éthylèneimine permettant la synthèse de l'PEI.	47

Schéma I.16 : Polymérisation des 2-R-2-oxazolines.	47
Schéma I.17 : Mécanisme réactionnel de la polymérisation de la 2-R-2-oxazoline par CROP : (a) amorçage, (b) propagation, (c) terminaison. A chaque étape, un équilibre (E) existe entre la forme cationique et la forme covalente de l'espèce en croissance. L'amorceur est composé d'un bon groupe partant (X = halogène (C, Br,I), tosylo (OTs) ou triflate (OTf) par exemple). Nu = agent de terminaison nucléophile.	49
Schéma I.18 : LCST des différents poly(2-oxazolines). (PMeOx : poly(2-méthyl-2-oxazoline), PetOx : poly(2-éthyl-2-oxazoline), PiPrOx : poly(2-isopropyl-2-oxazoline), PnPrOx : poly(2-propyl-2-oxazoline), PnbuOx : poly(2-butyl-2-oxazoline)). Adapté de ¹³⁴	50
Schéma I.19 : Fonctionnalisation possibles de PEI : (a) en début ou (b) fin de chaîne par le choix d'amorceurs ou agents de terminaison pertinents, (c) par substitution de l'hydrogène du motif EI, (d) par hydrolyse partielle des motifs Ox, (e) par fonctionnalisation de monomères Ox résiduels. ^{126,151}	54
Schéma I.20 : Stratégies de fonctionnalisation des PEI par (a) polymérisation de monomères fonctionnels, (b) la méthode « grafting from » et par (c) la méthode « grafting onto ». ^{137,152-157}	54
Schéma I.21 : Les différentes réactions permettant une fonctionnalisation des motifs éthylènimine : (a) réaction avec un chlorure d'acide, (b) amination réductive d'un aldéhyde, (c) formation d'urée par des isocyanates, (d) couplage DIC/DCC ou NHS-ester d'un acide carboxylique, (e) ouverture de cycle d'un époxyde, (f) substitution nucléophile, (g) alkylation réductive, (h) addition de Michael d'acrylonitriles ou (i) d'acrylates. Adapté de ^{159,160}	56
Schéma I.22 : Fonctionnalisation d'une PEI branchée par la transferrine. Adapté de ¹⁵⁵	58
Schéma I.23 : Synthèse de la His-/PEI : (a) synthèse du N-acryloyl-histidine par une réaction d'addition élimination et (b) synthèse de la His-/PEI par addition de Michael. Adapté de ¹⁶⁵ . 60	
Schéma I.24 : Différentes alternatives à la PEGylation : (a) poly(2-éthyl-2-oxazoline), (b) polyglycérol, (c) polypeptide, (d) polyacrylamide, (e) polyvinylpyrrolidone, (f) polymère zwitterionique et (g) systèmes à base de sucres. Extrait de ²⁰⁰	68
Schéma I.25 : Synthèse de copolymères POx-PEI par (a) couplage covalent d'une chaîne POx et d'une chaîne PEI ou par (b) hydrolyse de POx. (<i>b</i> = bloc, <i>g</i> = greffé, <i>stat</i> = statistique). ...	70
Schéma I.26 : Synthèse du PEOz- <i>b</i> -LPEI. ²¹⁵	73
Schéma I.27 : Sélectivité de l'hydrolyse du copolymère PEtOx- <i>b</i> -PMeOx en fonction du taux d'hydrolyse de MeOx. Extraite de ²¹⁹	74
Schéma I.28 : Structure de l'ADN double brin chargé négativement.....	75
Schéma I.29 : Conformation (a) en pelote statistique, (b) étirée d'un polyélectrolyte, (c) avec influence de l'écrantage des charges. Adapté de ²²³	77
Schéma I.30 : Représentation schématique de l'agrégation de polyélectrolytes en 3 étapes. Extrait de ²²⁷	78
Schéma I.31 : Les différents facteurs influençant la formation de complexes de polyélectrolytes. Adapté de ²²⁷	79
Schéma I.32 : Facteurs affectant les performances des polyplexes. Adapté de ²³⁷	84

Schéma II.1 : Synthèse de DHBCs PO _x - <i>b</i> -PEI par hydrolyse sélective de copolymères PO _{x1} - <i>b</i> -PO _{x2}	107
Schéma II.2 : Synthèse des PMeOx et structures des amorceurs et agents de terminaison utilisés.....	110
Schéma II.3 : Synthèse des copolymères PMeOx- <i>b</i> -PEtOx amorcés par le bromure d'allyle et terminés par de la pipéridine.	122
Schéma II.4 : Synthèse des copolymères PiPrOx- <i>b</i> -PMeOx.	127
Schéma II.5 : Synthèse des copolymères PEtOx- <i>b</i> -PEI.....	139
Schéma II.6 : Synthèse des copolymères PO _x - <i>b</i> -PEI.	144
Schéma III.1 : Synthèse de la L-histidine-N-acryloyle (HNA).	169
Schéma III.2 : Produit secondaire issu de l'homocouplage de deux molécules d'HNA.	170
Schéma III.3 : Modification de la PEI par la HNA <i>via</i> une addition de Michael.....	172
Schéma III.4 : Modification des copolymères PEI- <i>b</i> -PiPrOx par de la HNA ($m-x \ll x$). ..	175
Schéma III.5 : Synthèse du 3-mercaptopropyl- β -D-galactopyranoside.	182
Schéma III.6 : Fonctionnalisation de l'homopolymère PiPrOx par le 3-mercaptopropyl- β -D-galactopyranoside.	183
Schéma III.7 : Fonctionnalisation des H _{Px} par le 3-mercaptopropylgalactose.	187
Schéma IV.1 : Illustration schématique de l'ADN _p en sortie de pore : (a) complexation avec un polymère dirigée par une constante de vitesse k_1 , (b) interpénétration de deux plasmides ($C > C^*$) dirigée par une constante de vitesse k_2	245
Schéma IV.2 : Structure du sulfate de dextrane.	255
Schéma IV.3 : Représentation d'une courbe du pourcentage d'ADN _p relargué en fonction de la concentration en sulfate de dextrane.	257
Schéma IV.4 : Réaction de réduction du MTT en formazan.	260
Schéma IV.5 : Réaction de bioluminescence catalysée par l'enzyme luciférase de luciole. ²⁹	263

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : Liste des médicaments de thérapie génique utilisant un vecteur viral ou non viral et ayant une autorisation de mise sur le marché. ²³	22
Tableau I.2 : Diamètre des particules retenues par les différents organes. ³⁶	28
Tableau I.3 : Caractéristiques principales des vecteurs viraux. ^{27,64}	36
Tableau I.4 : Différents exemples de ligands de ciblage cellulaire.	57
Tableau I.5 : Propriétés biologiques du PEG et de la PMeOx. ^{199,208,209}	69
Tableau I.6 : Calcul des C* en fonction des R _G estimés par Smith <i>et al.</i> ²³⁶ pour trois plasmides linéarisés de taille variable.	83
Tableau II.1 : Synthèse de PMeOx témoins.	111
Tableau II.2 : Synthèse de PMeOx par chauffage conventionnel ou par micro-ondes.	115
Tableau II.3 : Synthèse de PEtOx témoins.	116
Tableau II.4 : Synthèse de PiPrOx témoins.	119
Tableau II.5 : Synthèse de copolymères PMeOx- <i>b</i> -PEtOx.	123
Tableau II.6 : Synthèse de copolymères PiPrOx- <i>b</i> -PMeOx.	128
Tableau II.7 : Hydrolyses basiques d'homopolymères POx pour la synthèse de PEI témoins.	132
Tableau II.8 : Hydrolyse des PMeOx témoins des copolymères PiPrOx- <i>b</i> -PMeOx.	134
Tableau II.9 : Synthèse de PEtOx- <i>b</i> -PEI.	140
Tableau II.10 : Synthèse des copolymères PiPrOx- <i>b</i> -PEI.	145
Tableau II.11 : Caractéristiques des différents homopolymères et copolymères utilisés dans la suite du manuscrit.	150
Tableau III.1 : Synthèses de HNA et évaluation de l'homocouplage en fonction du nombre de moles de L-histidine initial ([HNA] ₀ = 2 mol.L ⁻¹ et pH > 12).	171
Tableau III.2 : Modification des IPEI par la HNA.	173
Tableau III.3 : Modification des PEI- <i>b</i> -PiPrOx par de la HNA.	175
Tableau III.4 : Modification de HP5 (SAK-4) par la HNA dans les nouvelles conditions. ..	179
Tableau III.5 : Modification des PEI- <i>b</i> -PiPrOx par la HNA dans l'éthanol à reflux.	179
Tableau III.6 : Couplage thiol-yne sur GwD-110.	184
Tableau III.7 : Optimisation des conditions de la modification des HPx de différentes masses molaires par le 3-mercaptopropyl-β-D-galactopyranoside.	188
Tableau III.8 : Conditions de réaction et caractérisations des poly(2-méthyl-2-oxazoline)s.	190

Tableau IV.1 : Caractéristiques des familles de PEI- <i>b</i> -PiPrOx et PEI synthétisées au cours des chapitres 2 et 3 et utilisés pour les tests physico-chimiques et biologiques.....	217
Tableau IV.2 : Caractéristiques des familles PEI linéaires et en étoile synthétisées lors d'une précédente étude dans l'équipe.....	218
Tableau IV.3 : Paramètres et analyses DLS de formulations classiques à deux concentrations à partir d'une PEI(his).	221
Tableau IV.4 : Evaluation de la reproductibilité des formulations par extrusion d'ADN _p dans une solution de <i>star</i> PEI (PLL112) ou <i>l</i> PEI(his) (PLL131).	226
Tableau IV.5 : Comparaison de formulations par extrusion ou par voie classique à deux concentrations en ADN différentes avec une <i>l</i> PEI(his) comportant un bloc PEI de 15,9 kDa et fonctionnalisée à 11,4 % par l'histidine.	227
Tableau IV.6 : Paramètres et résultats des extrusions en fonction du diamètre de pore de la membrane avec une <i>l</i> PEI de 10 kDa.	228
Tableau IV.7 : Paramètres et résultats des extrusions en fonction de la pression d'extrusion avec une <i>l</i> PEI de 10 kDa.	230
Tableau IV.8 : Paramètres et résultats des extrusions réalisées avec une membrane de 30 nm et une pression de 1 bar en fonction de la masse molaire de la PEI.....	232
Tableau IV.9 : Paramètres et résultats des extrusions en fonction de l'architecture du polymère.	235
Tableau IV.10 : Paramètres et résultats des extrusions en fonction du ratio massique polymère/ADN _p avec une <i>l</i> PEI et une <i>l</i> PEI(his) comportant un bloc PEI de 10 kDa.	238
Tableau IV.11 : Paramètres et résultats des extrusions en fonction du pH de la solution de polymère.....	240
Tableau IV.12 : Paramètres des formulations classiques et par extrusion pour analyses Cryo-TEM.	241
Tableau IV.13 : Paramètres de formulation et analyses DLS des extrusions réalisées à partir de <i>l</i> PEI(his) avec un bloc PEI de 7,6 et 15,9 kDa (AF7 et PLL131 respectivement) à un WR _{polymer} 3/1.	271
Tableau IV.14 : Conditions et analyses des formulations par extrusion réalisées pour les expériences <i>in vivo</i>	278
Tableau IV.15 : Paramètres de formulation des polyplexes par voie classique pour les tests <i>in vitro</i> aux divers WR _{PEI} dans le cas d'une <i>l</i> PEI non fonctionnalisée.	292
Tableau IV.16 : Paramètres de formulation des polyplexes par voie classique pour les tests <i>in vitro</i> aux divers WR _{PEI} dans le cas d'une PEI fonctionnalisée.	292
Table V.1 : Chemical shifts of used deuterated solvents	301
Table V.2 : List of reagents used.....	305

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La thérapie génique développée au cours du XX^{ème} siècle à la suite des recherches de Frederick Griffith en bactériologie représente, aujourd'hui, un enjeu important dans le développement de nouveaux traitements. Les gènes constituent le génome de chaque individu et portent l'information génétique. Une anomalie sur l'un d'eux engendre des dysfonctionnements à l'origine de maladies dites génétiques. Au-delà des maladies rares d'origine génétique, les mutations génétiques sont également la cause des maladies acquises tels que les cancers ou encore les maladies neurodégénératives. Ces maladies peuvent alors potentiellement être traitées par la thérapie génique.

Lorsque la mutation est identifiée, un polynucléotide thérapeutique (ADN, ARNm, ARNsi etc...) est développé et utilisé comme médicament. Il doit être introduit dans les cellules cibles dans le but de corriger, de remplacer ou de moduler l'activité du gène altéré. Les premiers essais cliniques effectués à la fin des années 1980 ont été les prémices du développement de cette approche thérapeutique. Ces essais montrent cependant diverses limites : l'ADN présente un court temps de vie dans l'organisme réduisant fortement la transfection et sa nature polyanionique ne lui permet pas de passer efficacement les barrières biologiques, extra-cellulaires et intra-cellulaires, dans le but de rejoindre le cytosol ou le noyau des cellules cibles. L'efficacité thérapeutique étant alors limitée, de nombreuses recherches sont réalisées dans le but de développer des méthodes de vectorisation permettant une thérapie génique sûre et efficace.

Différentes stratégies sont à disposition en fonction de la maladie et de l'organe ciblé afin de véhiculer le matériel génétique jusqu'à la cellule cible. Tout d'abord, des méthodes physiques telles que l'électroporation ou la sonoporation ont été développées, mais représentent une approche d'administration locale. Les vecteurs viraux permettent un traitement médical de tout l'organisme et ont mené à la commercialisation de traitements de thérapie génique à base de virus. Par l'encapsulation du gène thérapeutique, le vecteur viral permet de limiter sa dégradation, augmente son temps de circulation dans l'organisme et présente une très bonne efficacité de transfection. Néanmoins, malgré leurs apports, leur caractère viral limite leur utilisation puisque des réactions immunogènes et une toxicité ont été observées empêchant de renouveler les traitements. C'est pourquoi les recherches se tournent vers des systèmes de vectorisation non-viraux. Ces vecteurs synthétiques peuvent être d'origine lipidique ou polymérique par exemple.

Les polymères cationiques offrant de nombreuses possibilités de synthèse sont très largement étudiés. En présence d'ADN, ils forment des complexes de taille nanométrique,

Introduction générale

nommés polyplexes par interactions électrostatiques entre les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN et les charges positives du polymère. Parmi les différents polymères cationiques étudiés en thérapie génique, la polyéthylèneimine (PEI) est la plus utilisée et est reconnue comme le *Gold Standard* en thérapie génique non-virale.

La très haute densité de charge de la PEI permet de très bons résultats en transfert de gènes *in vitro* et *in vivo* malgré une certaine toxicité. Des recherches sont menées dans le but d'améliorer ses performances notamment par la fonctionnalisation de la chaîne polymère. Tout d'abord, le greffage de ligands cellulaires ou de molécules biologiques facilitant le relargage de l'endosome a montré une amélioration du transfert de gènes. D'autre part, le design de nanoparticules théranostiques est également développé afin de mieux comprendre les étapes du transfert de gènes. Pour cela, des polymères fluorescents peuvent notamment être utilisés. Enfin, l'ajout de chaînes hydrophiles telles que le polyéthylène glycol (PEG) permet, d'autre part, de diminuer la toxicité et de rendre les polyplexes furtifs afin d'augmenter leur biodisponibilité.

Cependant, l'utilisation de chaînes PEG est aujourd'hui controversée. En effet, des réactions immunogènes sont répertoriées notamment avec l'activation du complément et l'apparition d'anticorps anti-PEG lors de l'injection de nanoparticules PEGylées. C'est pourquoi les recherches se tournent vers d'autres polymères biocompatibles. Parmi eux, les poly(2-oxazolines) (POx), polymères neutres, hydrophiles et facilement fonctionnalisables, montrent un intérêt en transfert de gènes non-viral. La POXylation est donc étudiée pour remplacer les chaînes PEG. De plus, ces polymères sont les précurseurs de la PEI. Les POx-*b*-PEI sont des copolymères possédant un bloc cationique permettant son association au plasmide et un bloc hydrophile neutre susceptible d'induire une furtivité, ce qui le classe parmi les candidats intéressants dans le domaine du transfert de gènes. A notre connaissance, la synthèse de ces copolymères est réalisée, à ce jour, uniquement par couplage de deux chaînes macromoléculaires entre elles. Cette méthode de synthèse présente divers inconvénients tels qu'un faible rendement et des étapes de purifications fastidieuses. En ce qui concerne l'hydrolyse sélective de copolymères poly(2-oxazoline), celle-ci est réalisée uniquement de manière partielle et mène donc à des copolymères statistiques.

Les paramètres physico-chimiques des nanoparticules doivent être contrôlés pour permettre un transfert de gènes efficace. Les recherches se sont intéressées à la compréhension des étapes de la complexation ainsi qu'à la méthode de formulation dans le but de formuler des polyplexes efficaces. Pour cela, les objectifs s'inspirent des thérapies virales qui ont fait leurs

preuves : la taille des complexes doit être de l'ordre de 50 à 100 nm et la concentration en ADN doit être au minimum de 0,6 mg.mL⁻¹.

Dans le cadre de cette thèse, qui fait partie intégrante du projet *Virus-Inspired NanoParticles* (VINP) financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), la synthèse de nanoparticules de taille inférieure à 100 nm composées de polymère et d'ADN plasmidique (ADN_p) avec pour objectif la transfection des cellules pulmonaires et/ou hépatiques est étudiée. Ce travail se divise en trois parties : tout d'abord, nous nous sommes consacrés à la synthèse de copolymères à blocs poly(2-oxazoline)-*b*-polyéthylèneimine *via* l'hydrolyse sélective de copolymères à blocs poly(2-R₁-oxazoline-*b*-2-R₂-2-oxazoline). Puis, ces polymères ont été fonctionnalisés dans le but d'améliorer les étapes de la transfection. Enfin, des polyplexes formulés par une nouvelle méthode dite « par extrusion » ont été réalisés dans l'objectif d'obtenir des nanoparticules de taille inférieure à 100 nm et ont été utilisés lors de tests *in vitro* et *in vivo*.

Ce manuscrit de thèse se compose de cinq chapitres.

Le premier chapitre s'intéresse à la bibliographie sur la thérapie génique non virale à base de polymères. L'historique de la thérapie génique ainsi que son concept et les diverses méthodes de transfection seront tout d'abord décrits. Puis, dans une deuxième partie, la polyéthylèneimine, polymère de référence, sera présentée en détail, de sa synthèse aux résultats biologiques obtenus. Dans le but d'améliorer les vecteurs à base de PEI, les différents types de fonctionnalisations possibles (sites de greffage et méthodes de greffage), ainsi que les groupements d'intérêt ayant démontré leur apport, seront exposés. Nous nous intéresserons, ensuite, plus particulièrement aux copolymères POx-*b*-PEI et à leurs méthodes de synthèse. Enfin, dans une dernière partie, la physicochimie des complexes sera présentée, de la formulation du complexe aux contraintes imposées par les tests biologiques.

Le second chapitre présente une nouvelle méthode de synthèse des POx-*b*-PEI par hydrolyse sélective de copolymères à blocs poly(2-R₁-oxazoline-*b*-2-R₂-2-oxazoline). Tout d'abord, deux types de précurseurs POx de différentes masses molaires seront synthétisés : des copolymères poly(2-méthyl-2-oxazoline)-*b*-poly(2-éthyl-2-oxazoline) et des copolymères poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-*b*-poly(2-méthyl-2-oxazoline). Le caractère thermosensible de ces copolymères permet une auto-organisation des macromolécules en solution sous forme de micelles cœur/couronne à haute température. Puis, des conditions donnant lieu à une hydrolyse sélective de la couronne seront mises au point pour obtenir les polymères POx-*b*-PEI ciblés.

Introduction générale

Dans un troisième chapitre, la fonctionnalisation de ces polymères est étudiée. Nous nous intéresserons à trois fonctionnalisations. La libération de l'ADN dans le cytosol des cellules est améliorée par l'ajout de résidus histidine (his) sur le polymère. Des copolymères PEI(his)-*b*-POx seront synthétisés afin d'optimiser le transfert de gènes. Dans un second temps, nous nous intéresserons à la fonctionnalisation des fins de chaînes polymère. Premièrement, un ligand cellulaire de type galactose permettant un ciblage actif sera couplé par chimie click sur l'extrémité hydrophile des copolymères PEI-*b*-POx. Dans un second temps, des poly(2-oxazoline)s portant un groupement fluorescent de type dansyle seront synthétisés pour permettre le suivi des polyplexes lors des tests biologiques.

Le quatrième chapitre présente la formulation des complexes polymères/ADN ainsi que leurs évaluations biologiques. Tout d'abord, une méthode de formulation des complexes « par extrusion » permettant l'obtention de solutions concentrées en polyplexes sera présentée et nous nous intéresserons à l'optimisation des conditions de formulation dans l'optique d'obtenir des polyplexes d'une taille inférieure à 100 nm. Ces polyplexes seront analysés par diffusion de la lumière et par cryo-microscopie électronique à transmission afin de déterminer leurs tailles et leurs structures. Puis, les efficacités de transfection et la cytotoxicité de ces nouveaux complexes polyvalents réalisés à partir des différentes familles de polymères seront étudiées *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats seront comparés aux polymères PEI témoins avec pour objectif d'observer une amélioration de la transfection et une diminution de la toxicité. Nous pourrons alors comparer l'influence de la masse molaire du polymère, de l'architecture du polymère et de la fonctionnalisation du polymère en fonction de la toxicité et de l'efficacité de transfection dans le but de déterminer les polymères les plus prometteurs.

Pour terminer, un cinquième chapitre présente la partie expérimentale et inclut ainsi les techniques d'analyse, le matériel utilisé et les protocoles expérimentaux.

Nous souhaitons préciser que les figures, schémas et tableaux seront présentés en anglais afin que la communauté internationale puisse prendre connaissance des données dans la version publiée en ligne de la thèse.

CHAPITRE 1

Etude bibliographique[†]

[†]Ce chapitre est le sujet d'une revue en cours de rédaction

Current Gene Therapy

Sommaire

Introduction	15
Partie I. La thérapie génique	17
I. Un peu d'histoire	18
I.1. Les prémices de la thérapie génique	18
I.2. Aujourd'hui : Où en sommes-nous ?	19
II. Le fonctionnement de la thérapie génique.....	23
II.1. Les différentes approches	23
II.2. Les étapes de la transfection d'un exogène	24
II.2.a. La formation du polyplexe.....	25
II.2.b. L' administration.....	26
II.2.c. Le transport extracellulaire	26
II.2.d. L'internalisation cellulaire	29
II.2.e. La sortie de l'endosome	32
II.2.f. Le trafic intracellulaire et l'internalisation dans le noyau	33
III. Les méthodes de transfection	34
III.1. Les méthodes physiques	34
III.2. Les vecteurs viraux.....	35
III.3. Les vecteurs non-viraux	37
III.3.a. Les vecteurs lipidiques.....	37
III.3.b. Les vecteurs de polymères	39
III.3.b.i. La poly(L-lysine).....	40
III.3.b.ii. La polyéthylènimine.....	41
III.3.b.iii. La polyallylamine.....	41
III.3.b.iv. La polyvinylamine.....	42
III.3.b.v. Les poly-L-histidine et polyvinylimidazole	42
III.3.b.vi. Les dérivés de polyacrylate et polyméthacrylate	43
III.3.b.vii. Les polysaccharides.....	43
Partie II. Les vecteurs PEI et les stratégies d'amélioration	45
I. La PEI : polymère de référence en thérapie génique non-virale	45
I.1. Ses caractéristiques	45
I.2. Les stratégies de synthèse	46
I.2.a. La CROP de l'aziridine.....	46
I.2.b. La CROP de 2-alkyl-2-oxazoline et leur hydrolyse.....	47
I.2.b.i. La synthèse des poly(2-oxazoline)s	47
I.2.b.ii. L'hydrolyse des poly(2-oxazoline)s.....	50
I.3. Son utilisation en thérapie génique	51
I.3.a. Le mécanisme d'internalisation des polyplexes à base de /PEI.....	51

I.3.b.	L'efficacité de transfection des PEI.....	51
I.3.c.	La toxicité des PEI.....	52
II.	Les stratégies d'amélioration du transfert de gènes par la PEI et leur apport	53
II.1.	Les différentes stratégies	53
II.1.a.	Les sites de greffage possibles.....	53
II.1.b.	Les méthodes de greffage	54
II.1.b.i.	Les méthodes avec monomères fonctionnels et « grafting from »	55
II.1.b.ii.	La méthode « grafting onto »	55
II.1.c.	Les réactions de couplage	55
II.2.	Les molécules d'intérêt	56
II.2.a.	Les ligands de ciblage cellulaire	56
II.2.b.	Les fonctionnalisations spécifiques du transfert de gènes	59
II.2.b.i.	L'échappement de l'endosome.....	59
II.2.b.ii.	La toxicité des vecteurs	60
II.2.b.iii.	Le transport dans le cytosol.....	61
II.2.b.iv.	L'entrée dans le noyau	61
II.2.c.	Les modifications permettant un diagnostic	61
II.2.c.i.	Les fluorophores organiques	62
II.2.c.ii.	Les particules inorganiques	63
II.3.	La PEGylation.....	64
II.3.a.	Le principe de la PEGylation.....	64
II.3.b.	La PEGylation en transfert de gènes.....	64
II.3.c.	Les limites de la PEGylation	67
II.3.d.	Les alternatives à la PEGylation	67
Partie III.	Les copolymères PEI-POx	69
I.	La POxylation <i>versus</i> la PEGylation.....	69
II.	Les méthodes de synthèse.....	70
II.1.	La méthode « coupling »	70
II.2.	L'hydrolyse de polyoxazolines.....	71
III.	Les copolymères PEI-POx en thérapie génique	71
III.1.	Les copolymères statistiques	71
III.2.	Les copolymères à blocs double hydrophiles PEI- <i>b</i> -POx	72
Partie IV.	La physicochimie des complexes ADN-Polymère	75
I.	La formation du complexe	75
I.1.	Les polyélectrolytes	75
I.1.a.	L'ADN, polyanion fort	75
I.1.b.	La polyéthylèneimine, polycation faible	76

I.2. La complexation.....	77
I.3. Méthode de formulation.....	79
II. Les contraintes des tests biologiques.....	81
II.1. <i>In vitro</i>	81
II.2. <i>In vivo</i>	82
Conclusion.....	84
L'objectif de la thèse	85
Références	86

Introduction

La thérapie génique a pour but d'introduire des acides nucléiques exogènes à vocation thérapeutique dans des cellules cibles afin de moduler intentionnellement le fonctionnement de la cellule ciblée, par exemple l'expression d'un gène. Les gènes constituent notre matériel génétique et l'ensemble de ces gènes sont le résultat d'un code constituant l'acide désoxyribonucléique (ADN).

L'ADN est une macromolécule polynucléotidique ayant une structure très ordonnée découverte par Watson et Crick en 1953.¹ Il est constitué de deux brins en double hélice formés d'unités de répétition nommées nucléotides. Ces nucléotides sont composés d'un groupe phosphate, d'un sucre, le désoxyribose, et d'une base. Il existe quatre types de bases - l'adénine (A), la thymine (T), la guanine (G), la cytosine (C) - qui sont complémentaires deux à deux par des liaisons hydrogène (A-T et G-C) et qui permettent l'organisation 3D des deux brins d'ADN. L'enchaînement des différentes bases, nommé séquence, porte l'information génétique et constitue les gènes.

Ce génome permet à la machinerie cellulaire de synthétiser toutes les protéines et autres molécules nécessaires au fonctionnement de l'organisme d'un être vivant. Or, si une mutation de l'ADN a lieu, c'est-à-dire un changement dans la séquence nucléotidique, le gène correspondant ne permettra pas la synthèse correcte de la protéine correspondante entraînant l'apparition de pathologies. Dans le cas où un unique gène est défectueux, nous parlons de maladies monogéniques et la thérapie génique peut alors être envisagée.

Ce type de traitement s'est, aujourd'hui, développé pour de nombreuses maladies : maladies génétiques, cancers, maladies infectieuses ... De nombreuses recherches ont été et sont encore menées de nos jours dans ce domaine.

Ce chapitre a pour objectif de définir les bases de ce projet de thèse. Dans un premier temps, un intérêt particulier sera porté à la thérapie génique. Après avoir défini ce qu'est la thérapie génique, un historique de ses prémices à la commercialisation des premiers traitements sera retracé, puis le mécanisme et les différentes étapes du transfert de gènes seront détaillés. Nous verrons que l'ADN seul ne permet pas d'atteindre l'efficacité nécessaire et que des vecteurs sont généralement utilisés. Les différents types de vecteurs développés afin d'améliorer l'efficacité du traitement seront présentés en deux parties : les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux. Dans une deuxième partie, un intérêt particulier sera porté à la

Chapitre 1 : Etude bibliographique

polyéthylènimine, le « gold standard » en matière de transfection non virale, et les différentes possibilités d'amélioration de ce vecteur seront étudiées avec, tout d'abord, les stratégies de ciblage et de « trafficking », puis, les stratégies de furtivité. Nous nous intéresserons, dans une troisième partie, au développement des copolymères à base de polyoxazoline (POx) et de polyéthylènimine (PEI), constituants potentiels de vecteurs, avec un aperçu des différentes possibilités de synthèse de ces copolymères puis un intérêt particulier sera porté aux copolymères présentant une double hydrophilie. Enfin, une dernière et quatrième partie portera sur la physicochimie des complexes ADN-polymère avec, premièrement, un regard sur les interactions régissant la formation de ces complexes, puis les contraintes apportées par les études *in vitro/in vivo* seront explicitées.

Partie I. La thérapie génique

La thérapie génique est définie par différents organismes de santé. Au niveau national, un médicament de thérapie génique est défini par l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) comme suit :

« Un médicament de thérapie génique (MTG) est un produit obtenu par un ensemble de procédés de fabrication visant au transfert d'un gène prophylactique, diagnostique ou thérapeutique chez l'homme et son expression consécutive *in vivo*. Le transfert d'un gène implique un système d'expression contenu dans un système d'administration appelé vecteur qui peut être d'origine virale ou non virale ». ²

L'agence européenne des médicaments (AEM) donne, quant à elle, la définition suivante : « Un médicament de thérapie génique (GTMP - Gene therapy medicinal product) est un médicament biologique qui présente les caractéristiques suivantes :

(a) il contient une substance active qui contient ou consiste en un acide nucléique recombinant utilisé ou administré à des êtres humains en vue de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou supprimer une séquence génétique et ;

(b) son effet thérapeutique, prophylactique ou de diagnostique se rapporte directement à la séquence d'acide nucléique recombinante qu'il contient, ou au produit de l'expression génétique de cette séquence.

Les médicaments de thérapie génique n'incluent pas les vaccins contre les maladies infectieuses.» ³ [*Traduction*]

Cette définition parle ici de séquences d'acides nucléiques qui peuvent être des ARN messagers (ARNm) ou encore des siARN (small interfering RNA), et non pas uniquement des gènes codés par de l'ADN, comme dans la définition donnée au niveau national. Cette ouverture à d'autres stratégies thérapeutiques est importante puisque des recherches ont souligné que différents types de matériel génétique permettaient l'obtention de résultats positifs en thérapie génique comme en témoignent Wolff *et al.* ⁴ ou Song *et al.* ⁴ qui furent les premiers à utiliser, respectivement, un ARNm et un siARN pour une application thérapeutique.

Enfin, la US Food and Drug Administration (FDA) décrit les médicaments de thérapie génique comme des « produits qui induisent leurs effets par transcription et/ou traduction du matériel génétique introduit et/ou par intégration dans le génome hôte et qui sont administrés sous forme d'acides nucléiques, de virus ou de micro-organismes génétiquement modifiés. Le

produit peut être utilisé pour modifier les cellules *in vivo* ou transféré à des cellules *ex vivo* avant l'administration au receveur ». ⁵ [Traduction]

En comparaison aux deux précédentes, cette dernière définition souligne le fait que les transfections peuvent être réalisées *in vivo* ou *in vitro*. Cela permet d'imaginer différents types de modifications génétiques et ainsi d'élargir les stratégies possibles.

I. Un peu d'histoire ...

I.1. Les prémices de la thérapie génique

Les premiers travaux de génétique débutent dans le domaine de la bactériologie quelques décennies avant que le terme de « thérapie génique » ne soit évoqué. En effet, c'est Frederick Griffith, un bactériologiste anglais, qui débute ces recherches en 1928. ⁶ Il s'intéresse à la pneumonie bactérienne et met en évidence, par hasard, la transformation d'un pneumocoque inoffensif en une forme virulente sans avoir identifié l'acteur de cette mutation. Après de nombreuses expériences sur ces pneumocoques pour interpréter cette transformation, Avery *et al.* ⁷ démontrent, en 1944, que l'acide désoxyribonucléique en est le protagoniste et devient alors un important sujet de recherche.

Par la suite, Zinder et Lederberg ⁸ découvrent, en 1952, ce qu'ils appelleront la transduction, c'est-à-dire le mécanisme de transport de l'ADN d'une bactérie à une autre *via* un bactériophage. Ce phénomène sera très vite développé afin d'être utilisé comme un outil bénéfique dans les recherches en bactériologie mais également dans le domaine des virus eucaryotes. Il faudra ensuite attendre 1962 pour que Szybalski ⁹ réussisse le premier transfert héréditaire de gène *in vitro* sur des cellules de mammifère.

Le terme « thérapie génique » fait alors son apparition en 1966 avec E. L. Tatum ¹⁰ qui parle pour la première fois d'ingénierie génétique et de la possible utilisation de virus dans un but thérapeutique. Les virus se multiplient en détournant la machinerie cellulaire à leur avantage : l'introduction du génome viral dans la cellule hôte conduit à la synthèse de nouveaux virus par la cellule elle-même. L'idée de Tatum est alors de modifier les virus en éliminant leur matériel génétique, et donc leur pouvoir pathogène, afin d'y incorporer un ADN thérapeutique. Après un essai infructueux de Rogers *et al.* ¹¹ en 1973, S.A. Rosenberg ¹² réussit le premier transfert de gène sur un humain, officiellement accepté par the Recombinant DNA Advisory Committee (RAC). Cette expérience est réalisée en 1989 sur des patients atteints d'un mélanome métastatique auxquels un marqueur de gène a été introduit.

Débutent alors de nombreux essais de transfert de gènes thérapeutiques, dont notamment celui de M.R. Blaese¹³ en 1990. Cet essai vise deux enfants atteints d'une déficience en adénosine désaminase (ADA-DCID). Une thérapie génique *ex vivo* est réalisée : leurs cellules prélevées puis transfectées *ex vivo* afin d'exprimer le gène codant pour l'adénosine désaminase sont réimplantées, le résultat est concluant temporairement pour un des patients. Puis, le premier essai de transfert de gène thérapeutique *in vivo* à l'aide de rétrovirus et d'adénovirus est réalisé, en 1995, par Puumalainen *et al.*¹⁴

La thérapie génique connaît alors des années de recherches intensives. Cependant, en 1999, un essai clinique en cours à l'université de Pennsylvanie à Philadelphie est à l'origine du premier décès d'un jeune patient de 18 ans traité par thérapie génique. Jesse Gelsinger est victime d'une très forte réponse de son système immunitaire à la suite d'une injection à très haute dose d'adénovirus.¹⁵ Les investigations révèlent que le protocole validé par le National Institutes of Health (NIH) n'avait pas été respecté. Les recherches, arrêtées le temps de mettre en lumière ces erreurs, ont alors repris avec une obligation d'un suivi très précis du protocole.

I.2. Aujourd'hui : Où en sommes-nous ?

Les recherches en thérapie génique ont connu un essor très important depuis le début des années 2000 avec 3025 essais cliniques, aujourd'hui, recensés. Le journal scientifique « journal of gene medicine » répertorie et classe les différents essais cliniques selon plusieurs paramètres.¹⁶ Ces données, mises à jour en décembre 2019, soulignent, d'une part, que les cancers et les maladies monogéniques sont les maladies les plus traitées par ces essais cliniques (**Figure I.1.a**) et, d'autre part, que les vecteurs utilisés sont majoritairement des virus. Ils représentent en effet 2077 essais sur les 3025, soit 69 % (**Figure I.1.b**).

Aujourd'hui en France, une trentaine d'essais cliniques sont en cours (phase I à III) principalement à visée oncologique.¹⁷

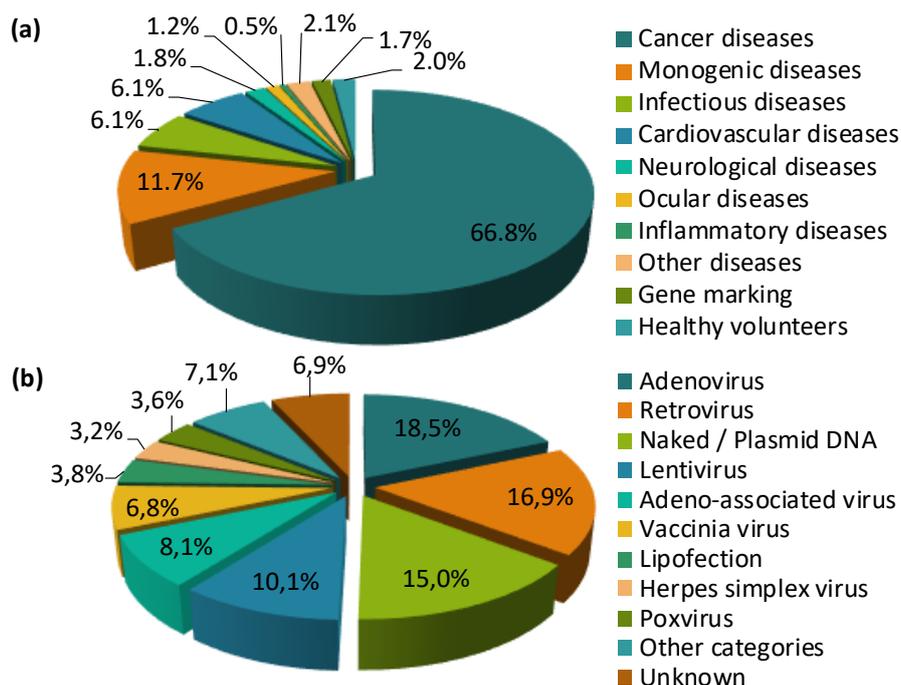


Figure I.1 : Répartitions des essais cliniques de thérapie génique selon (a) les maladies traitées et (b) le type de vecteurs utilisé. Adapté de¹⁶

De ces nombreux essais cliniques effectués dans le monde, quelques victoires ont permis la commercialisation de traitements de thérapie génique utilisant différents types de vecteurs. C'est en 2003 que le premier médicament est mis sur le marché en Chine. La GendicineTM est un vecteur adénoviral visant le traitement des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.¹⁸ Un deuxième traitement à base d'adénovirus pour le traitement de cancers, Oncorine, est également accepté en Chine en 2005. Puis, suit Glybera®, le premier traitement de thérapie génique accepté par l'Union Européenne, en 2012, pour les déficits en lipoprotéine lipase utilisant un virus adéno-associé de sérotype 1 (AAV1).¹⁹ Aux Etats-Unis, il faut attendre 2015 pour que le premier traitement de thérapie génique soit approuvé avec l'autorisation de mise sur le marché d'un virus d'Herpes sous le nom ImlygicTM pour traiter des mélanomes.²⁰

Récemment, les médicaments de thérapie génique non viraux voient leurs tests cliniques aboutir, leur permettant ainsi d'être commercialisés. En 2018, le premier médicament de ce type est mis sur le marché aux USA et en Europe. OnpatroTM vectorise un siRNA pour les amyloses héréditaires grâce à un liposome (composé de heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(diméthylamino) butanoate, DLin-MC3-DMA, α -(3'-{[1,2-di(myristyloxy) propanoxy] carbonylamino}propyl)- ω -méthoxy polyoxyéthylène, PEG₂₀₀₀-C-DMG, distéaroyl phosphatidylcholine, DSPC et cholestérol).²¹ Aujourd'hui un intérêt est porté à ce type de

traitement pour agir contre des maladies pulmonaires comme la pandémie actuelle du coronavirus ou l'asthme grâce à l'inhalation de médicaments à base de siRNA notamment.²²

Néanmoins, le coût élevé de ces thérapies est défavorable à une large commercialisation. Ainsi, Glybera®, développé par UniQure, reçoit le titre de « médicament le plus cher au monde en 2015 » avec un coût de 1 million de dollars. Aujourd'hui, ce traitement n'est plus commercialisé par manque de demande. Strimvelis™, un retrovirus accepté en 2016 en Europe, coûte, quant à lui, 665 000 dollars par thérapie. Depuis sa mise sur le marché, uniquement 5 patients ont été traités via cette thérapie.

Malgré ces échecs commerciaux, d'autres traitements sont développés et commercialisés. Le **Tableau I.1** récapitule les médicaments, aujourd'hui, acceptés dans le monde utilisant un vecteur.²³ D'autres médicaments utilisant de l'ADN mais sans vecteurs tels que Spinraza™, Tegsedi® ou encore Givlaari® sont également commercialisés. Ces derniers sont répertoriés dans la revue de Pedraz et coll.²⁴ réalisée en 2020.

Aujourd'hui, la thérapie génique reste un domaine en large développement avec de nombreuses équipes de recherches travaillant toujours dans le domaine.

Tableau I.1 : Liste des médicaments de thérapie génique utilisant un vecteur viral ou non viral et ayant une autorisation de mise sur le marché.²³

Nom commercial	Date d'autorisation	Agence	Indication	Vecteur
Vecteurs viraux				
Gendicine™	10/2003	SFDA	Carcinome épidermoïde de la tête et du cou	Adénovirus
Oncorine®	11/2005	SFDA	Cancer nasopharyngé réfractaire au stade avancé	Adénovirus
Glybera® ^(a)	12/2012	EMA	Déficience en lipoprotéine lipase	AAV1
Imlygic™	10/2015 12/2015	FDA EMA	Mélanome	Virus herpès simplex
Zalmoxis™ ^(a)	09/2016	EMA (Autorisation conditionnelle)	Personnes transplantées de cellules souches hématopoïétiques	Rétrovirus/ Virus herpès simplex
Strimvelis™	05/2016	EMA	Déficience en adénosine désaminase (ADA-SCID)	Rétrovirus
Kymriah™	08/2017 08/2018	FDA EMA	Leucémie lymphoblastique aiguë	Lentivirus
Yescarta®	10/2017 08/2018	FDA EMA	Lymphome à lymphocytes B	Rétrovirus/ lentivirus
Luxturna™	12/2017 09/2018	FDA EMA	Dystrophie rétinienne	AAV2
Zolgensma®	05/2019	FDA	Atrophie musculaire spinale	AAV9
Zynteglo®	05/2019	EMA	Bêta-thalassémie	Lentivirus
Vecteur non-viral				
Onpattro™	08/2018 08/2018	FDA EMA	Amylose induite par la transthyrétine (hATTR)	Liposome DLin-MC3- DMA

SFDA : State Food and Drug Administration - Chine

AEM : Agence Européenne du Médicament

FDA : Food and Drug Administration – Etat-Unis

(a) Il faut prendre en compte que le médicament Zalmoxis™ n'est aujourd'hui plus autorisé dû à un bénéfice trop faible en comparaison avec les traitements existants et Glybera® n'est plus commercialisé aujourd'hui.

II. Le fonctionnement de la thérapie génique

II.1. Les différentes approches

Différents types de maladies peuvent être traitées par thérapie génique. Pour cela, différentes approches ont été répertoriées par Wang et Gao et sont présentées ici :²⁵

a) La thérapie d'augmentation génétique : cette approche est utilisée dans le cas où les cellules produisent une protéine non efficace. Le but est, dans ce cas, de transférer un exogène additionnel aux cellules qui permettra de synthétiser une protéine fonctionnelle. **(Schéma I.1.a)**

b) La thérapie génique d'inhibition : parfois, la mutation génétique engendre des protéines actives mais malignes, elles ont alors une activité néfaste pour l'organisme. La transfection d'un nouveau gène aura pour but d'inhiber son expression afin de rétablir une activité normale. **(Schéma I.1.b)**

c) La mort de cellules spécifiques : dans cette dernière approche, ce n'est pas une protéine qui est visée mais un type cellulaire malin. Le gène transféré permettra, soit l'autosuicide des cellules **(Schéma I.1.c.i)**, soit l'activation du système immunitaire pour donner lieu à la destruction de ces cellules **(Schéma I.1.c.ii)**. Un ciblage cellulaire est alors primordial afin de ne pas toucher les cellules saines.

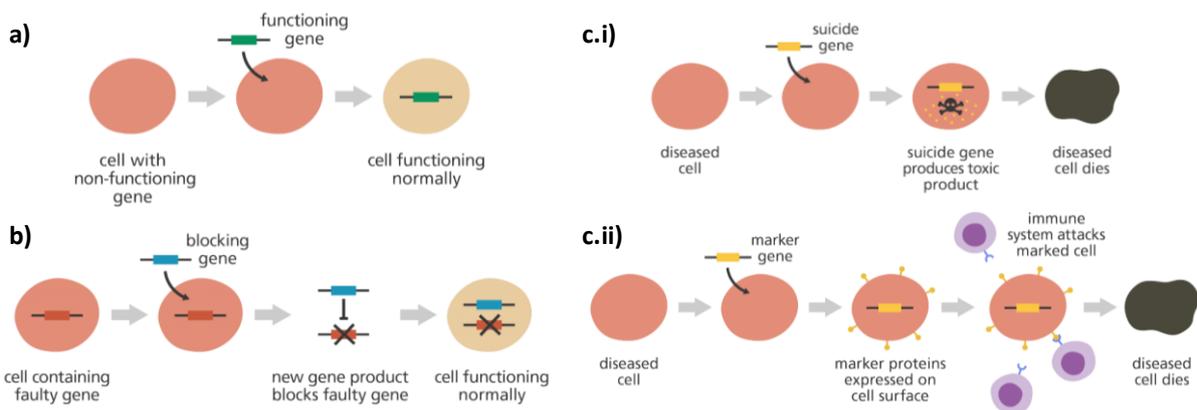


Schéma I.1 : Les différentes approches en thérapie génique : (a) la thérapie d'augmentation génétique, (b) la thérapie d'inhibition génétique, (c) la destruction d'un type cellulaire. Extrait de²⁶

Quelle que soit l'approche choisie pour traiter la maladie, la thérapie génique s'effectue uniquement sur les cellules somatiques et il est important de rappeler que deux stratégies peuvent être envisagées **(Schéma I.2)** :²⁷

- La technique *in vivo* avec une administration directe du traitement dans l'organisme. Différentes voies sont possibles telles que l'injection systémique ou l'administration locale (intramusculaire, nébulisation dans les poumons...).²⁸⁻³⁰ Le traitement est alors soumis aux différentes barrières de l'organisme et les cellules ne sont donc pas toutes transfectées et l'efficacité reste donc faible.
- La technique *ex vivo* : elle consiste à prélever des cellules chez le patient. Ces cellules sont ensuite cultivées en laboratoire afin de les modifier *in vitro* avec le gène thérapeutique puis sont réimplantées chez le malade. L'avantage de ce type de thérapie est l'absence de réponse immunitaire. Cependant, lors de la réimplantation, une faible partie des cellules réimplantées reste viablee.

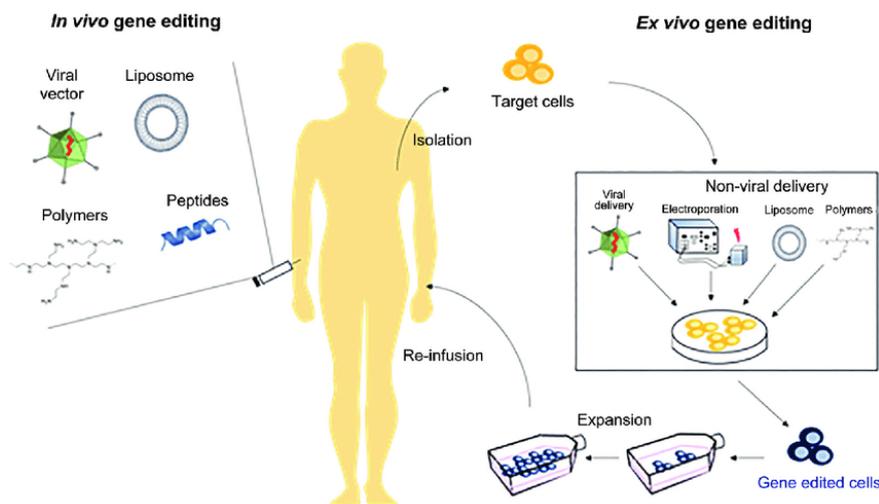


Schéma I.2 : Les différentes techniques de thérapie génique : *in vivo* et *ex vivo*. Extrait de³¹

II.2. Les étapes de la transfection d'un exogène

Le transfert de gènes a pour finalité l'introduction du matériel génétique dans la cellule. Cependant, avant cette étape, de nombreuses barrières biologiques sont à franchir (**Schéma I.3**).

Ces différentes étapes sont détaillées ci-dessous. Le **schéma I.3** représente la transfection d'un ADN plasmidique (ADN_p, ie. circulaire) complexé par un polymère cationique (vecteur non viral). Les différents types de vecteurs ainsi que leurs avantages et inconvénients seront discutés dans la partie III.

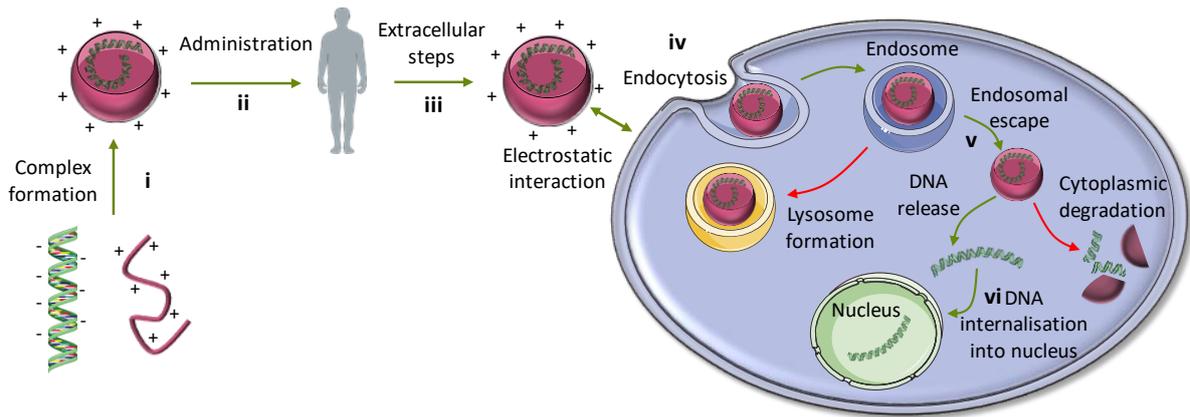


Schéma I.3 : Les différentes étapes de la transfection : (i) formation d'un complexe ADN/polymère, (ii) administration du traitement, (iii) les différentes barrières biologiques extracellulaires, (iv) endocytose du vecteur, (v) libération du vecteur dans le cytoplasme, (vi) migration dans le cytosol et entrée de l'ADN dans le noyau.

L'utilisation d'un vecteur permettra de protéger l'ADN en augmentant son temps de vie dans l'organisme et ainsi son efficacité. Ce vecteur peut être soit de nature virale soit non-virale. Selon le mode d'administration, le vecteur contenant la charge nucléotidique devra franchir différentes barrières extracellulaires jusqu'aux cellules cibles. L'internalisation dans la cellule peut se faire selon différents mécanismes, dépendant en particulier de la nature du vecteur et de la taille de celui-ci, mais l'endocytose est souvent observée. Enfin, l'étape d'échappement de l'endosome est impérative afin de libérer l'ADN dans le cytosol puis il migrera jusqu'au noyau pour y être internalisé dans le cas d'un ADNp.

II.2.a. La formation du polyplexe

L'ADN est une macromolécule chargée négativement de très haute masse molaire. Le transport de cette molécule dans l'organisme est difficile. Seul, il lui est très difficile de franchir les différentes barrières biologiques, l'efficacité du traitement est alors extrêmement faible. Un vecteur se révèle nécessaire (**Schéma I.3.i**).

Un ADN plasmidique a une taille de plusieurs centaines de nanomètres : par exemple, des plasmides de 5,76, 9,80 ou 16,8 kbp ont des diamètres de 260 à 386 nm dans leur forme circulaire ouverte.³² Les interactions électrostatiques entre l'ADNp chargé négativement et le polymère chargé positivement permettent la condensation de l'ADN en une forme super-enroulée et d'aboutir à une taille compatible à celle pouvant être internalisée par une cellule. On obtient alors un complexe de taille nanométrique, nommé polyplexe, comprenant plusieurs copies d'ADN, pouvant transporter l'ADNp vers l'intérieur d'une cellule, tel un vecteur. Cette complexation protège ainsi le matériel génétique des nucléases à l'origine de sa destruction

dans l'organisme.³³ De par le mode de formation du complexe, il n'y a pas de limite de taille de l'ADN dans ce cas.

II.2.b. L' administration

Dans le cadre d'une thérapie génique *in vivo*, le choix du mode d'administration (**Schéma I.3.ii**) est un paramètre important qui va définir les barrières rencontrées lors du transport extracellulaire. En fonction de l'organe ou des tissus ciblés, le traitement peut être administré par voie systémique ou locale (intramusculaire, nébulisation dans les poumons...).

II.2.c. Le transport extracellulaire

Malgré la protection de l'ADN par un vecteur, les polyplexes sont, tout de même, considérés comme des corps étrangers par l'organisme. Ils sont alors soumis à des mécanismes de défense du système immunitaire et à des barrières liées à la taille des nanoparticules (**Schéma I.3.iii**). Dans le cadre de ce travail, deux possibilités sont envisagées pour atteindre les poumons, organe cible de notre étude : par voie systémique ou par aérosol. Nous nous intéresserons donc uniquement à ces deux voies dans ce chapitre.

Dans le cas d'une administration par aérosol, la principale barrière extracellulaire est le diamètre du réseau pulmonaire. Il est important que les particules nébulisées puissent arriver en tout point des poumons, de la trachée jusqu'à la zone respiratoire, soit les bronchioles (diamètre de 1 à 5 μm) et les alvéoles (diamètre < 1 μm).³⁴ Ainsi, les gouttelettes contenant les polyplexes pourront pénétrer en profondeur si elles ont une taille inférieure à 1 μm (**Schéma I.4**). De plus, la présence de mucus dans le réseau pulmonaire, d'autant plus dense et important chez une personne malade, ralentit la diffusion des nanoparticules et complique la diffusion des polyplexes. Enfin, la rencontre de macrophages et de phagocytes, avant l'entrée dans les cellules cibles, peut mener à la destruction des polyplexes, reconnus comme corps étrangers.³⁵

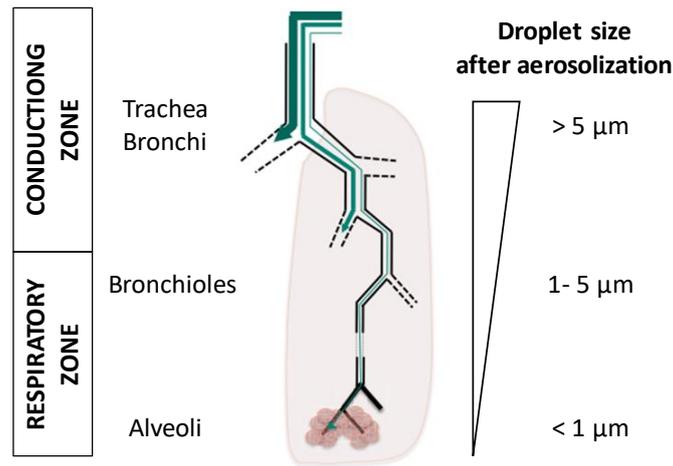


Schéma I.4 : Pénétration des gouttelettes aérosolisées dans les poumons selon leur taille. Adapté de³⁵

Lors d'une injection par voie intraveineuse, solution qui est la plus reproductible, les polyplexes sont transportés par le flux sanguin aux différents organes selon le **Schéma I.5**. Les polyplexes vont rencontrer de nombreux mécanismes de clairance via les éléments du sang ou dans les différents organes, comme décrits par Bertrand et Leroux.³⁶

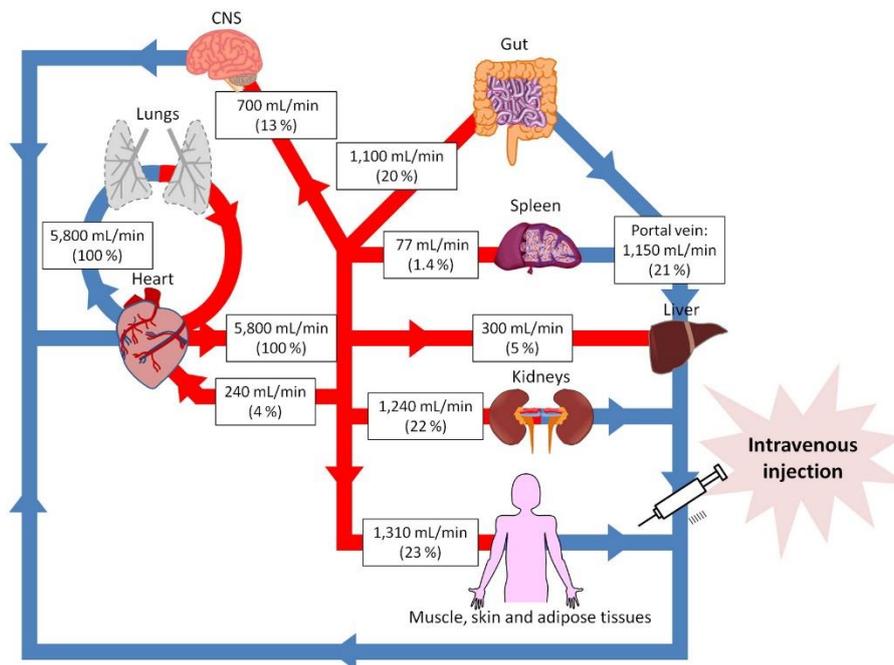


Schéma I.5 : Distribution du flux sanguin dans les différents organes. Extrait de³⁶

Après leur injection, les polyplexes se dirigent vers le cœur, puis le poumon, où ils rencontrent la première barrière biologique. Les poumons ont des capillaires compris entre 2 et 13 µm. Ainsi, les particules supérieures à 10 µm restent piégées en permanence, celles entre 3 et 6 µm seront d'abord bloquées puis libérées pour rejoindre la circulation sanguine et les particules inférieures à 3 µm ne sont en aucun cas retenues par les poumons. La rétention des

grosses particules pouvant causer des thromboses ou des embolies pulmonaires, il semble donc primordial de contrôler la taille des polyplexes.

De plus, lors de leur circulation dans le système sanguin, les polyplexes rencontrent les différents composants du sang, en particulier les protéines sériques (opsonines et dysopsonines). Ces dernières risquent d'interagir avec les polyplexes en fonction de leurs propriétés de surface.³⁷ En effet, ces protéines vont se déposer à la surface des nanoparticules et alors augmenter leur taille. Ce dépôt est d'autant plus facilité que les nanoparticules sont grandes car leur rayon de courbure est plus faible. L'augmentation de la taille des nanoparticules facilitera alors leur élimination par les macrophages et la reconnaissance des protéines déposées en surface engendrera l'activation du facteur du complément et la clairance par les divers organes.³⁸

En effet, le flux sanguin est ensuite distribué aux organes (**Schéma I.5**). Ceux-ci peuvent développer différents mécanismes qui leur sont propres afin d'éliminer les nanoparticules. Nous pouvons citer par exemple les cellules de Kupffer dans le foie qui vont, par phagocytose, capter les particules couvertes par les opsonines ou reconnues par les récepteurs de ces cellules.³⁹ Cela est très fréquent pour les particules entre 1 et 3 μm . De plus, les organes filtrent les particules selon leurs tailles (**Tableau I.2**). Dans le cas de la filtration rénale, nous noterons que les particules inférieures à 6 nm (correspondant à des polymères de masse molaire 30 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ environ) seront éliminées.

Tableau I.2 : Diamètre des particules retenues par les différents organes.³⁶

Organes	Tailles des particules retenues
Poumons	> 10 μm
Reins	< 6 nm (30 kDa)
Foie	> 1 μm
Rate	> 0.2 μm

Le design de nanoparticules de taille supérieure à 10 nm et inférieure à 100 nm semble donc un objectif important afin de permettre une circulation prolongée dans le sang et éviter la clairance par les différents organes et les différents mécanismes de défense de l'organisme. La probabilité des polyplexes de rejoindre les cellules cible en sera augmentée.

II.2.d. L'internalisation cellulaire

Après avoir passé les barrières extracellulaires, il est nécessaire que les polyplexes soient internalisés dans les cellules afin de rejoindre le noyau de celles-ci. Les nanoparticules rencontrent alors la membrane cellulaire composée d'une bicouche phospholipidique avec, à sa surface, de nombreuses protéines et autres biomolécules. Cette membrane est chargée négativement et va donc pouvoir interagir par interactions électrostatiques avec le polyplexe chargé positivement (**Schéma I.3.iv**). Les différents mécanismes d'internalisation déterminent, ensuite, le parcours intracellulaire pour rejoindre le noyau.⁴⁰ Ils se divisent en deux catégories: une entrée directe des nanoparticules dans la cellule ou une absorption par endocytose.

L'internalisation par voie directe est peu fréquente. Néanmoins, une intervention humaine à l'aide des mécanismes physiques présentés ultérieurement peuvent favoriser ce type d'internalisation.

L'endocytose, processus majoritaire, regroupe les mécanismes d'internalisation mettant en route la machinerie cellulaire et biologique tels que la phagocytose, la macropinocytose ou la voie clathrine dépendante.^{40,41} Le **Schéma I.6** regroupe les différents types d'endocytoses (a) et illustre schématiquement l'internalisation dans la cellule (b).

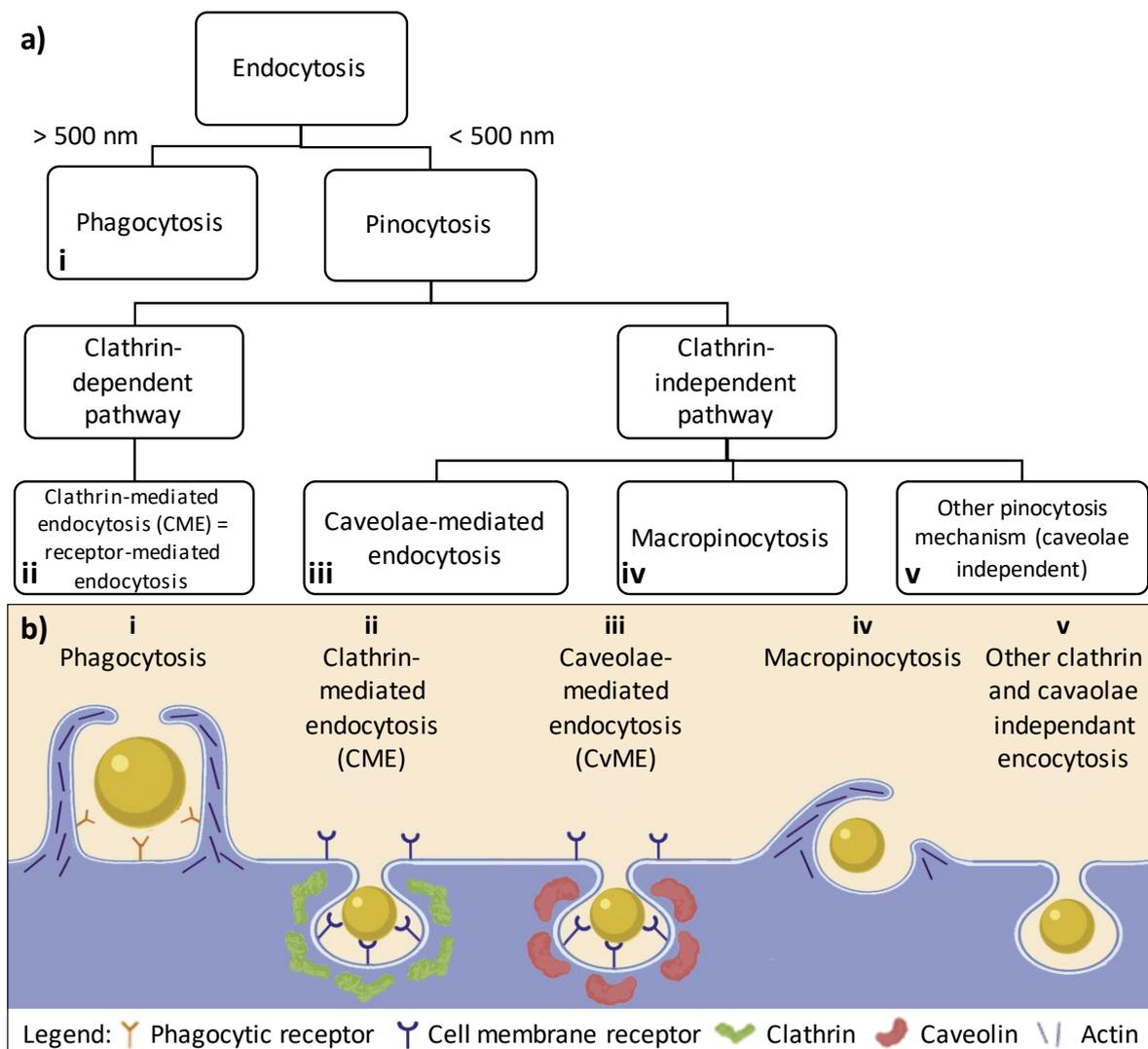


Schéma I.6 : (a) Organisation et (b) schéma des voies d'internalisation cellulaire par endocytose. Adapté de^{40,41}

L'endocytose peut se produire par phagocytose ou pinocytose. Le choix entre ces deux types d'internalisation cellulaire se fait selon la taille des particules. La phagocytose est la voie préférentielle dans le cas de nanoparticules de taille supérieure à 500 nm alors que les plus petites nanoparticules utilisent la pinocytose.

La phagocytose (du grec *phagein* « manger » et *cytos* « cellule ») est utilisée pour éliminer les éléments pathogènes comme les bactéries ou encore les cellules mortes. C'est un des mécanismes de défense du système immunitaire.⁴² Les macrophages ou les neutrophiles reconnaissent ces éléments *via* leurs surfaces. Les récepteurs phagocytaires vont ainsi reconnaître des ligands présents à la surface de leurs cibles ou encore les opsonines s'étant déposées sur celles-ci. Le mécanisme de phagocytose se met en place : des pseudopodes entourent la cible afin de l'internaliser (**Schéma I.6.b.i**). Un phagosome est alors formé et

fusionne avec les lysosomes afin de détruire la cible.⁴³ Dans notre travail, cette voie d'internalisation n'est pas souhaitée car elle amène à la digestion du polyplexe et donc à une clairance du traitement pour les administrations systémiques en particulier. La formulation de nanoparticules de taille inférieure à 100 nm devrait donc nous affranchir de ce mécanisme.

La pinocytose (la « boisson » de la cellule), quant à elle, se divise selon des voies clathrine dépendante ou indépendante.

Tout d'abord, la voie clathrine dépendante (CME) a lieu, soit par interaction hydrophobe ou électrostatique, soit par liaison de récepteurs membranaires aux ligands de surface des nanoparticules (de nombreuses familles de récepteurs et de ligands sont possibles). Cette interaction spécifique a été plus largement étudiée. Après la connexion à ces récepteurs, la nanoparticule est entourée par des protéines cytosoliques, nommées clathrines, afin de réaliser une cavité qui formera une vésicule intracellulaire entre 100 et 500 nm (**Schéma I.6.b.ii**). Cette vésicule est ensuite libérée des clathrines en surface afin de permettre son association avec d'autres endosomes.⁴⁴

En ce qui concerne la voie clathrine indépendante, trois mécanismes peuvent y être différenciés : la voie cavéoline dépendante (CvME), la macropinocytose et les autres voies clathrine et cavéoline indépendantes.

La voie CvME fonctionne comme la voie clathrine dépendante. Après une activation par reconnaissance ligand-récepteur, une vésicule se forme grâce à des protéines de cavéoline en surface (coté cytoplasmique) afin d'internaliser les nanoparticules (**Schéma I.6.b.iii**). Cependant, la destination intracellulaire de ces vésicules est différente puisqu'elles se dirigeront vers l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique.⁴⁵

Par macropinocytose, aucun récepteur n'est nécessaire pour son déclenchement. C'est l'activation d'un récepteur de croissance qui va alors augmenter la polymérisation de l'actine et former une excroissance comme présenté sur le **Schéma I.6.b.iv**. Cela va permettre l'internalisation de nanoparticules ainsi que d'un large volume extracellulaire. Les vésicules, nommées macropinosomes, ont un diamètre compris entre 0,5 et 10 μm . Les macropinosomes vont, ensuite, fusionner avec des endosomes puis avec des lysosomes.⁴⁶

Enfin, la voie clathrine et cavéoline indépendante permet l'internalisation de nanoparticules notamment par les voies Arf6-dépendante, RhoA-dépendante ou cdc-42-dépendante par exemple. (**Schéma I.6.b.v**)

Parmi toutes ces voies d'endocytose, la voie CME est reconnue comme majoritaire pour l'internalisation des nanomédicaments, dont les polyplexes utilisés dans le cadre de la thérapie génique.⁴⁷ Cependant, il est difficile d'identifier une unique voie d'internalisation des polyplexes car différents types cellulaires peuvent internaliser par différents mécanismes les mêmes particules. Ainsi, le mécanisme d'endocytose cavéoline dépendant est également utilisé par certaines cellules pour encapsuler les polyplexes.³³

II.2.e. La sortie de l'endosome

Après l'internalisation du polyplexe dans la cellule, celui-ci se trouve dans un endosome précoce dont le pH est de 7,4. Cet endosome va alors mûrir pour devenir un endosome tardif. Pendant cette maturation, un changement de pH a lieu afin d'acidifier le milieu grâce aux pompes ATPase, le pH de l'endosome tardif étant de 6,5.⁴⁸ Une fusion avec un lysosome pourra avoir lieu. Celui-ci, d'un pH très acide, autour de 4,7, contient des enzymes qui vont conduire à la dégradation du contenu de ces vésicules. Il est donc primordial que les polyplexes puissent sortir de l'endosome à son stade précoce, afin de ne pas détruire l'exogène qui doit rejoindre ensuite le noyau cellulaire (**Schéma I.3.v**).

Un mécanisme d'éponge à protons a été proposé comme facilitant la sortie de l'endosome. Dans notre cas, un polymère à base de polyéthylèneimine (PEI), portant des groupes histidines, utilise ce mécanisme décrit dans le **Schéma I.7**. En effet, ces amines ont un effet tampon, comme décrit par Jean-Paul Behr et coll.⁴⁹ Lors de l'acidification des endosomes, des protons sont amenés par les ATPases du cytoplasme vers l'intérieur de la vésicule. Afin d'équilibrer les charges et de maintenir l'équilibre osmotique, des ions chlorures et des molécules d'eau entrent également dans l'endosome (**Schéma I.7.b**). Cependant, les groupements amines des polyplexes situés dans l'endosome vont capter les protons, leurs pKa se situant dans cette gamme de pH. Dans le cas de PEI, il a été mis en évidence que les amines secondaires passent de 15 % de protonation dans le milieu extracellulaire à 45 % de protonation dans un lysosome dû à l'acidification du pH de 7,4 à 5.⁴⁹ Il sera alors nécessaire, pour les ATPases, de faire entrer plus de protons dans l'endosome pour diminuer le pH, menant également à l'entrée de plus d'ions chlorures et d'eau. Cela conduira à la déstabilisation et à la rupture de la membrane endosomale qui induira le relargage du polyplexe dans le cytosol. (**Schéma I.7.c**) Il est cependant important de mentionner que les études ne montrent pas si le plasmide seul ou le polyplexe sort de l'endosome.

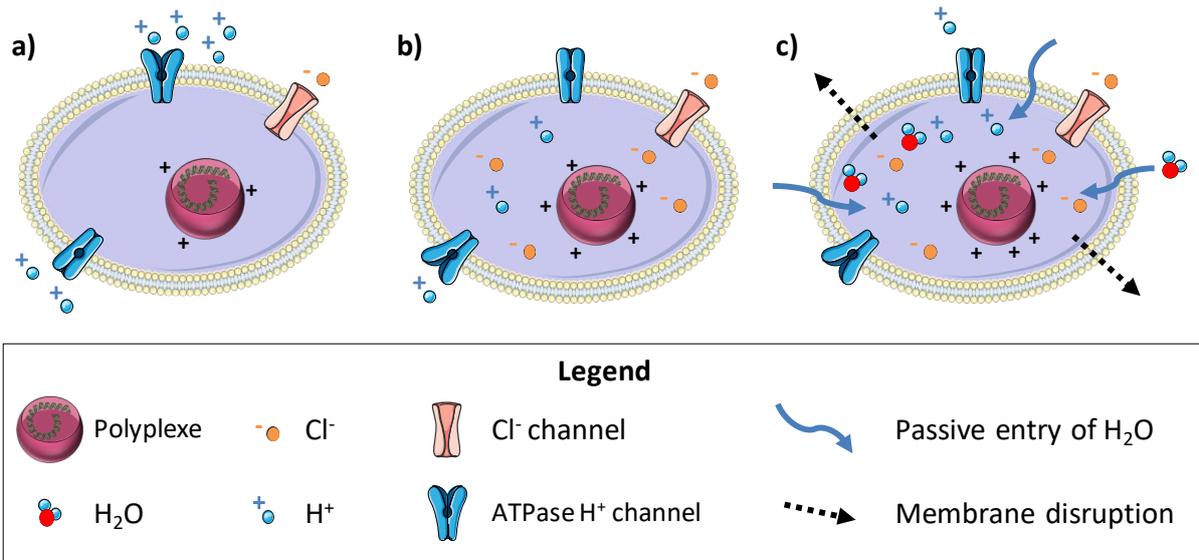


Schéma I.7 : Mécanisme d'éponge à protons induit par le polyplexe : (a) acidification de l'endosome par les ATPase, (b) entrée de protons H^+ et d'ions Cl^- et protonation du polyplexe par effet éponge à protons, (c) arrivées supplémentaires d'ions et de molécules d'eau entraînant la déstabilisation de la membrane.

II.2.f. Le trafic intracellulaire et l'internalisation dans le noyau

Lorsque le polyplexe est libéré dans le cytosol, la dernière étape est sa migration vers le noyau afin d'y être internalisé (**Schéma I.3.vi**). Ce transport au sein de la cellule a été étudié pour en comprendre son fonctionnement.³³

Les cellules eucaryotes présentent un cytosquelette crucial pour leur fonctionnement puisqu'il permet la réalisation de nombreux événements intracellulaires. Ce cytosquelette est formé de deux éléments filamenteux majoritaires : les microtubules⁵⁰ et l'actine⁵¹. Ils permettent le transport des organites intracellulaires, des vésicules ainsi que des protéines. Ce transport s'effectue le long de ce réseau notamment à l'aide de protéines associées aux microtubules (MAP). Fajac et coll.⁵² ont signalé que le transport intracellulaire du polyplexe jusqu'au noyau *via* les microtubules et l'actine du cytosquelette était primordial pour une bonne transfection. En effet, ils ont observé que si le squelette de microtubules ou d'actine est inhibé, le transfert de gène diminue de 75 et 50 % respectivement. Les deux squelettes sont donc nécessaires au transport du polyplexe dans le cytosol afin de permettre une accumulation périnucléaire des polyplexes et ainsi un transfert de gènes efficace.

La translocation nucléaire est alors la dernière barrière au transfert de gènes. Celui-ci peut avoir lieu *via* les pores nucléaires d'un diamètre de 30 nm, soit de manière passive pour les petites molécules (ions, acides aminés, protéines ...), soit de manière active pour les

molécules qui présentent un peptide NLS (nuclear localization signals) permettant une reconnaissance. Cependant, ce transport par les pores nucléaires est très peu efficace. Des stratégies sont donc développées afin d'améliorer cette internalisation, notamment Breuzard *et al.*⁵³ ont découvert que l'insertion de séquence 3NF dans le plasmide afin de permettre la liaison avec le facteur de transcription NFκB facilite l'internalisation nucléaire. Cette stratégie avec l'utilisation d'un polyplexe à base de LPEI a permis de multiplier par 6 le nombre de plasmides 3NF internalisés par rapport au plasmide non modifié lors de la transfection *in vitro* de cellules HeLa.

Néanmoins, le processus majeur d'internalisation des plasmides lors des expériences *in vitro* a lieu lors de la mitose pour les cellules non-quiescentes (qui peuvent se diviser). En effet, pendant une division cellulaire, la membrane nucléaire est détruite, le matériel génétique est donc en libre mouvement dans le cytosol pendant la division, puis la membrane nucléaire se reforme autour des chromosomes et internalise alors le plasmide se trouvant à proximité. *In vivo*, à un instant t, moins de 1 % des cellules sont en division réduisant très fortement la possibilité de ce type d'internalisation passive.⁵⁴

III. Les méthodes de transfection

Afin de permettre un transport efficace de gènes thérapeutiques et le passage des différentes barrières biologiques que nous venons de voir, différentes solutions ont été développées afin de faciliter la transfection et se classent en deux catégories : les méthodes physiques et les méthodes utilisant des vecteurs viraux ou non-viraux.

III.1. Les méthodes physiques

L'ADN nu peut être utilisé seul, cependant, son efficacité est très faible. Des méthodes physiques de délivrance d'ADN ont donc été mises au point. Ce type de vectorisation est peu utilisé dû à la complexité de réalisation. Ainsi, les différentes méthodes seront simplement décrites ici.^{27,55}

L'électroporation a pour but de déstabiliser la membrane cellulaire grâce à un courant électrique. Le matériel génétique peut alors pénétrer dans la cellule pendant ce temps de déstabilisation.⁵⁶ Cette technique, utilisée *in vivo* ou *in vitro*, améliore le transfert de gènes par rapport à un ADN nu et ne peut être utilisée que localement.^{57,58}

La sonoporation va permettre une transfection par application d'un champ d'ultrasons de l'ordre du megahertz. Les ultrasons vont créer des bulles de cavitation permettant la

formation de pores dans la membrane cellulaire et donc l'entrée dans la cellule de l'exogène situé à proximité.⁵⁹

La méthode hydrodynamique est réalisée par injection d'un grand volume d'une solution d'ADN sous pression dans un vaisseau sanguin. La solution va alors passer du vaisseau sanguin à l'organe environnant et entrer dans les cellules.⁶⁰

Le bombardement de particules (« gene gun ») se réalise en présence de particules d'or ou de tungstène, sur lesquelles de l'ADN est adsorbé. La technique consiste à propulser ces particules de 1 à 3 µm de diamètre sur les cellules cibles. Ces particules vont alors pénétrer dans la cellule et libérer ensuite le matériel génétique.⁶¹

La magnétofection utilise des nanoparticules magnétiques combinées au matériel génétique. Par application d'un champ magnétique externe, les particules vont se concentrer à l'endroit désiré. Cette technique s'utilise en couplage avec une thérapie génique virale ou chimique, c'est-à-dire avec un vecteur et très rarement avec une molécule d'ADN nu. Cette vectorisation permet une concentration rapide du traitement au niveau des cellules cibles.^{62,63}

Cependant, les difficultés de mise en œuvre ainsi que les effets indésirables de ces méthodes pouvant modifier l'activité cellulaire freinent leur utilisation. Très peu d'études cliniques sont donc réalisées avec ce type de traitement. Leur intérêt pourrait se développer plutôt en combinaison avec une formulation d'ADN utilisant un vecteur.

III.2. Les vecteurs viraux

Les virus ont été les premiers vecteurs à être développés pour la thérapie génique. En effet, ils se répliquent par transfection de leur matériel génétique dans les cellules eucaryotes, et donc humaines. Ainsi, après désactivation de leur partie virale et insertion d'un exogène thérapeutique dans la capsid virale, ces vecteurs présentent une très bonne efficacité de transfection. Cela explique les si nombreux essais cliniques réalisés avec des virus (**Figure I.1.b**) et les très nombreux traitements commercialisés avec ce type de vecteur (**Tableau I.1**).

Afin de répondre aux différentes maladies ciblées, les chercheurs ont mis au point différents types de vecteurs viraux pouvant être utilisés en thérapie génique.²⁷ Ils se différencient par les caractéristiques suivantes :

- Le mécanisme de transfection,
- La taille du transgène pouvant être incorporé,

- Le temps d'expression du transgène (l'incorporation du transgène dans le matériel génétique de la cellule cible permet une expression stable, s'il n'est pas intégré, l'expression du gène n'est que transitoire),
- La transfection *in vivo* ou *in vitro*,
- Les cellules ciblées.

Les différents types de virus, leurs propriétés ainsi que leurs avantages et inconvénients sont résumés dans le **Tableau I.3**.

Tableau I.3 : Caractéristiques principales des vecteurs viraux.^{27,64}

Type de Virus	Taille (nm)	Taille du génome (kb)	Temps d'expression	Intégration du gène	Avantages	Inconvénients
Rétrovirus	100	8	Stable	Aléatoire		Mutagenèse insertionnelle
Adénovirus	80	35	Court	Non	Large gamme d'hôtes	Immunogénicité Inflammation
Virus Adéno-associé	20	4,8	± Stable	Oui ou Non	Gamme d'hôtes assez large	Mutagenèse insertionnelle
Virus Herpès simplex	150-200	150	Court	Non	Faible toxicité	Neurotoxique Mutagenèse insertionnelle
Lentivirus	80-130	10	Stable	Aléatoire	Cellules en division ou non	Mutagenèse insertionnelle Recombinaison du VIH
Poxvirus	150-450	> 25	Stable	Non	La plupart des lignées cellulaires mammifères	Haute immunogénicité

Tout d'abord, nous pouvons citer les vecteurs rétroviraux. Ceux-ci sont capables de transfecter les cellules en division et intègrent leur matériel génétique dans le génome de la cellule cible. L'expression du gène est donc permanente mais peut présenter des risques majeurs en cas d'insertion au mauvais endroit dans le génome. Cavazzana-Calvo et son équipe en firent la mauvaise expérience lors d'un traitement par rétrovirus qui a conduit à une leucémie chez deux patients.⁶⁵ De plus, leur faible efficacité *in vivo* et leur incapacité à transfecter des cellules quiescentes ont limité leur utilisation.

Les vecteurs adénoviraux présentent l'avantage de pouvoir infecter une large gamme de lignées cellulaires et de ne pas intégrer le gène dans le matériel génétique de la cellule hôte.⁶⁶ Cela permet d'éviter une insertion aléatoire mais donne lieu, alors, à une expression transitoire ou limitée dans le temps. Cependant, l'inconvénient majeur de ces virus est la réaction inflammatoire produite par l'organisme. C'est ce type de virus qui conduira au décès de Jesse Gelsinger en 1999.¹⁵ Son utilisation est donc controversée.

Afin de pouvoir être développés à plus grande échelle, les recherches se sont orientées vers des vecteurs viraux plus sûrs, notamment les virus adéno-associés (AAV).⁶⁷ C'est ce type de vecteur qui sera le premier à être commercialisé avec le Glybera®. Ils ne présentent pas de pouvoir pathogène chez l'homme mais leur petite taille ne permet pas la transfection de larges gènes (maximum 4,8 kb). Ils sont aujourd'hui le sujet de plusieurs programmes de développement, notamment financés par le Généthon.⁶⁸

Les vecteurs issus du virus de l'Herpès simplex sont intéressants pour leur capacité à transférer un gène de très haute masse molaire et semblent être de bons candidats pour les délivrances au niveau du système nerveux.⁶⁹ Les lentivirus, quant à eux, sont utilisés pour leur capacité à transférer des cellules non-divisibles telles que les cellules souches du système nerveux central.^{70,71} Enfin, les poxvirus permettent l'insertion stable d'un exogène de masse molaire élevée.⁷²

Cependant, le caractère viral de ces vecteurs crée des limites à leurs utilisations. Des réactions immunogènes et carcinogènes révélées par différents types de virus, une limitation de la taille de l'ADN vectorisé ainsi qu'un coût très élevé de production mènent les recherches à s'orienter vers des méthodes de vectorisation non-virales.⁷³⁻⁷⁵ Les vecteurs non-viraux peuvent être composés de lipides ou de polymères.

III.3. Les vecteurs non-viraux

III.3.a. Les vecteurs lipidiques

Les vecteurs peuvent être de nature lipidique. Le terme de lipoplexe est employé pour désigner le complexe formé entre l'ADN et le lipide et l'action de transfection par un lipoplexe se nomme alors lipofection.

Un lipide est un composé amphiphile comportant une tête hydrophile et cationique dans le cas présent, ainsi qu'une chaîne grasse entre 12 et 18 atomes de carbone. Grâce à leur caractère amphiphile, ces lipides cationiques s'autoorganisent sous différentes formes :

liposomes, micelles ou encore bicouches lipidiques lamellaires en fonction du paramètre d'empilement. Ce paramètre corrélé aux volumes et longueur de chaque partie détermine l'organisation des lipides. Ces assemblages de lipides, en général des liposomes, vont pouvoir ensuite interagir via des interactions électrostatiques avec les molécules d'ADN.

Les lipoplexes ainsi formés peuvent présenter différentes structures (**Schéma I.8**) selon l'auto-organisation initiale des lipides. Des structures lamellaires ou hexagonales sont ainsi composées d'une alternance de domaines lipidiques et d'ADN. Ces organisations peuvent migrer de l'une à l'autre en fonction des paramètres de la solution, tels que la température, le pH ou encore la présence de sels.

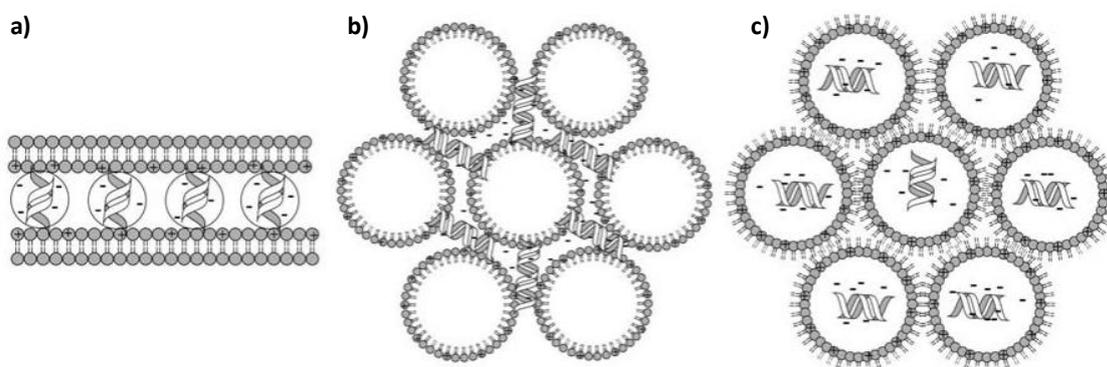


Schéma I.8 : Les différentes structures des lipoplexes : (a) la structure lamellaire L_{α} , (b) la structure hexagonale H_I^C , (c) la structure hexagonale inversée H_{II}^C . Extrait de⁷⁶

Les recherches sur les lipides cationiques ont commencé à la fin des années 1980 avec les recherches menées par Felgner *et al.*⁷⁷ Le DOTMA (chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium) est alors le premier lipide cationique monovalent synthétisé en 1987.

De nombreuses recherches sont menées dans ce domaine et permettent la synthèse de différents lipides. De nouveaux lipides monovalents mais également des lipides multivalents sont développés. J-P Behr synthétisa ainsi la DOGS (dioctadecylamidoglycylspermine) en 1986.⁶⁶ De plus, des lipides neutres, tels que la DOPE (dioléyl-phosphatidyléthanolamine) ou le cholestérol et ses dérivés, sont souvent utilisés en association avec les lipides cationiques afin de diminuer la toxicité et d'améliorer la transfection. Le **Schéma I.9** représente la structure de ces différents lipides. Des préparations commerciales ont vu le jour comme par exemple la Lipofectin® qui est un mélange de DOTMA et de DOPE.

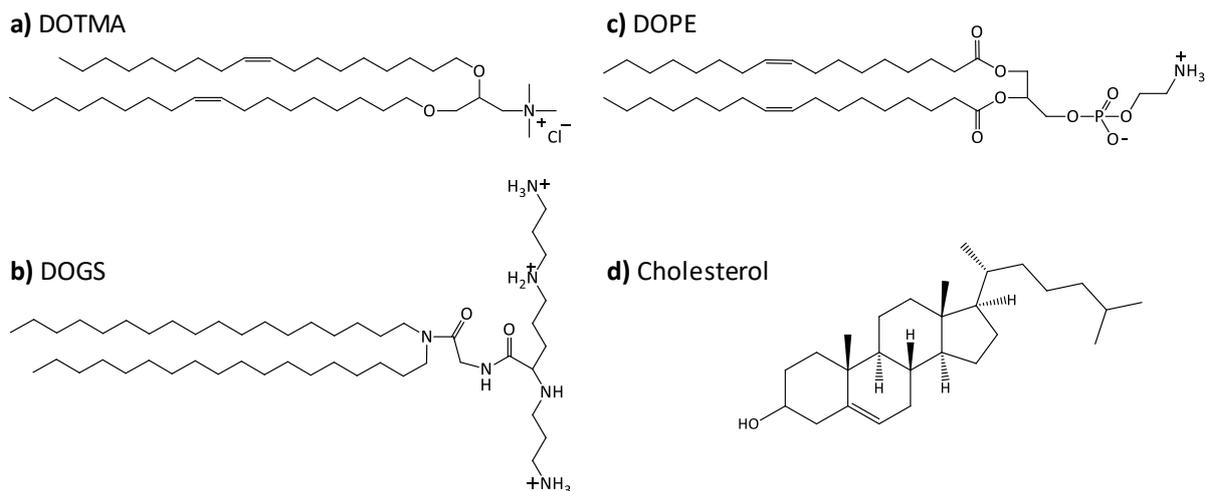


Schéma I.9 : Structure de différents lipides utilisés pour le transfert de gènes : (a) le chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTMA), (b) la dioctadécylamidoglycylspermine (DOGS), (c) la dioléyl-phosphatidyléthanolamine (DOPE), (d) le cholestérol.

Concernant leur mécanisme d'action, ces vecteurs entrent dans les cellules *via* des mécanismes d'endocytose. Leur structure lipidique va permettre la sortie de l'ADN de l'endosome grâce à la fusion entre deux membranes, par un mécanisme nommé flip-flop (**Schéma I.10**).⁷⁸

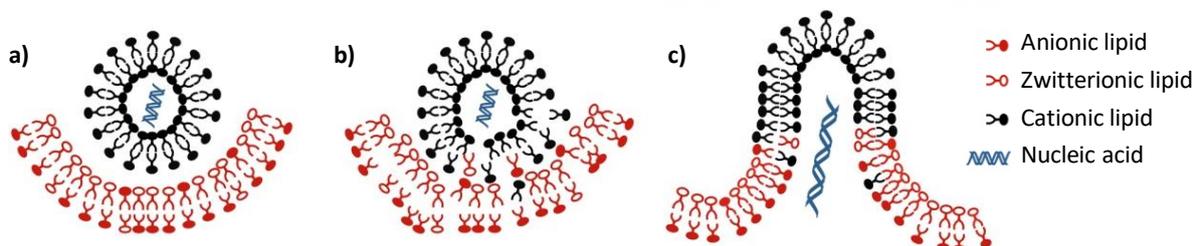


Schéma I.10 : Mécanisme d'échappement de l'endosome : (a) le lipoplexe est encapsulé dans un endosome, (b) les lipides cationiques du lipoplexe interagissent avec les lipides de la membrane endosomale, (c) la fusion des deux membranes permet la libération de l'ADN dans le cytosol. Extrait de⁷⁹

Cette technique reste aujourd'hui limitée, dû au faible temps de circulation du lipoplexe dans l'organisme, ainsi que la toxicité des liposomes chargés. De récentes recherches rapportent la mise au point de nouveaux liposomes stimuli-sensibles⁸⁰, furtifs⁸¹ ou encore permettant un ciblage actif.⁸² Ces nouvelles pistes d'amélioration de ces dispositifs permettront peut-être un transfert de gènes plus efficace.

III.3.b. Les vecteurs de polymères

Les polyplexes, complexes ADN/polymères, ont été développés en parallèle des lipoplexes. L'idée d'utiliser les polymères comme vecteurs non-viraux pour la thérapie génique

apparaît avec Wu *et al.*⁸³ en 1987 qui ont utilisé de la poly-L-lysine (PLL). Les avantages des polymères sont nombreux. Nous pouvons, entre autres, citer leur production aisée et à faible coût, leurs différentes structures (linéaire, branchée, étoile, dendrimère), leur fonctionnalisation aisée, et encore leur faible immunogénicité. Ces nombreuses possibilités sont à l'origine de l'essor des recherches sur ce sujet afin de les rendre compétitifs face aux virus exhibant une efficacité plus importante.

Ainsi, de nombreux polymères ont été étudiés pour cette application avec notamment la polyéthylèneimine qui est aujourd'hui reconnue comme être la référence pour la thérapie génique à base de polyplexes.⁸⁴ Les principaux polymères étudiés sont présentés ci-après, de façon non exhaustive. Le **Schéma I.11** présente leurs structures.

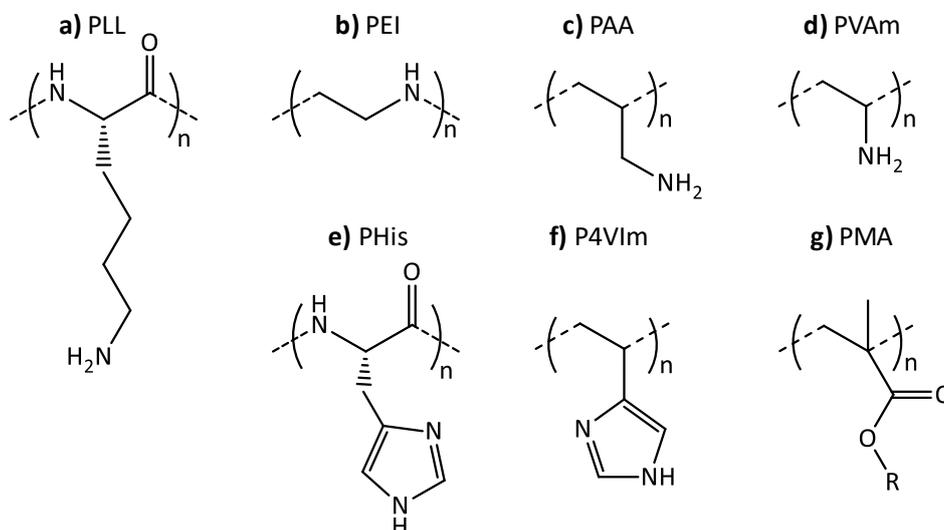


Schéma I.11 : Structures des différents polymères utilisés en thérapie génique : (a) poly(L-lysine), PLL ; (b) polyéthylèneimine, PEI ; (c) Polyallylamine, PAA ; (d) polyvinylamine, PVAm ; (e) polyhistidine, PHis ; (f) poly(4-vinylimidazole), P4VIm ; (g) polyméthacrylate possédant une chaîne pendante aminée, par exemple poly(aminoéthylméthacrylate) PAEMA dans le cas où R = $-(CH_2)_2-NH_2$.

III.3.b.i. La poly(L-lysine)

La PLL (**Schéma I.11.a**) est le premier polymère utilisé en thérapie génique. Sa nature peptidique offre, d'une part, de nombreuses amines grâce aux motifs lysine, lui permettant de condenser l'ADN,⁸⁵ et, d'autre part, une biodégradabilité par les fonctions amide. Cependant, l'absence de propriété tampon nécessaire à la sortie de l'endosome limite son efficacité que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

Différentes études ont donc été menées pour améliorer son pouvoir de transfection : Midoux *et al.*⁸⁶ indiquent que le greffage d'histidines sur la chaîne polymère est bénéfique à la

transfection *in vitro* de cellules HepG2. Wolffert et *al.*⁸⁷ expérimentent eux l'ajout fructueux de chloroquine et de l'hémagglutinine INF7 sur la transfection *in vitro* des cellules 293. Ces modifications ont permis une diminution de la toxicité et ont conduit à un meilleur pouvoir de transfection.

III.3.b.ii. La polyéthylèneimine

La PEI (**Schéma I.11.b**) est le polymère le plus étudié en thérapie génique et est aujourd'hui la référence en thérapie génique non-virale. Sa capacité à encapsuler l'ADN et ses propriétés tampon facilitant la sortie de l'ADN de l'endosome en font un très bon candidat. Les premières utilisations en transfert de gènes ont été réalisées en 1995 par Boussif *et al.*⁴⁹

Par la suite, différentes structures ont été développées (linéaire, branchée, hyper-branchée) ainsi que différentes substitutions pour améliorer la transfection. Ce polymère étant à la base de mon travail de thèse, les différentes recherches à son sujet sont développées plus largement dans la partie II.

III.3.b.iii. La polyallylamine

La polyallylamine (PAA) peut posséder une haute densité de charge jusqu'à une charge cationique par unité grâce à ses amines primaires pendantes (**Schéma I.11.c**). Ce polyélectrolyte peut donc condenser l'ADN en nanoparticules de façon très efficace.⁸⁸ Néanmoins, cette densité de charge est à l'origine d'une toxicité importante et, au même titre que la PLL, ce polymère présente un faible pouvoir tampon ne permettant pas une sortie efficace de l'endosome.⁸⁹

Des modifications de la polyallylamine peuvent permettre d'améliorer ses propriétés. Ainsi, Boussif *et al.*⁹⁰ ont travaillé sur ce polymère en réalisant une glycosylation d'une partie des amines primaires. Les meilleurs résultats de transfection sur des cellules A549 sont obtenus pour un taux de substitution de 75 %. Dans ce cas, le PAA est moins toxique que son analogue non substitué et est autant efficace qu'une PEI 22 kDa pour le transfert de gènes. De leur côté, Pichon et coll.⁹¹ ont synthétisé un nouveau vecteur à base de dérivés de PAA. Le polymère comporte différents ratios d'amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires. Ces différentes amines permettent la condensation effective de l'ADN tout en garantissant le mécanisme d'éponge à proton nécessaire à la sortie de l'endosome. Ainsi, le polymère comportant 20 % d'amines quaternaires et 30 % d'amines primaires présente une toxicité moins importante ainsi qu'une transfection améliorée sur des cellules HeLa en comparaison à la PEI linéaire.

III.3.b.iv. La polyvinylamine

Ce polymère PVAm, de structure très proche de la PAA, est un isomère de la PEI mais comporte une amine primaire directement liée au squelette hydrocarboné du polymère (**Schéma I.11.d**). Ceci permet alors d'augmenter le potentiel de densité de charge pour accroître la condensation de l'ADN et former les polyplexes, cependant il est injustement négligé dans les recherches au profit d'autres polymères disponibles plus efficaces pour le transfert de gènes.⁹²

En effet, Dréan *et al.*⁹³ se sont intéressés à la synthèse de dérivés du PVAm. Des copolymères ont été synthétisés à l'aide de précurseurs poly((N-vinyl acétamine)-*co*-(vinyl acétamide)) (P(MNVA-*co*-NVA) partiellement hydrolysés. Les polymères ainsi obtenus présentent 4 motifs de répétition et sont notés P(MVAm-*co*-NVAm) (**Schéma I.12**). Des substitutions de type guanidine ou imidazole ont permis d'obtenir une efficacité comparable à celle de la PEI avec une toxicité plus faible sur des cellules HeLa, 16HBE, C2C12 et DC2.4.

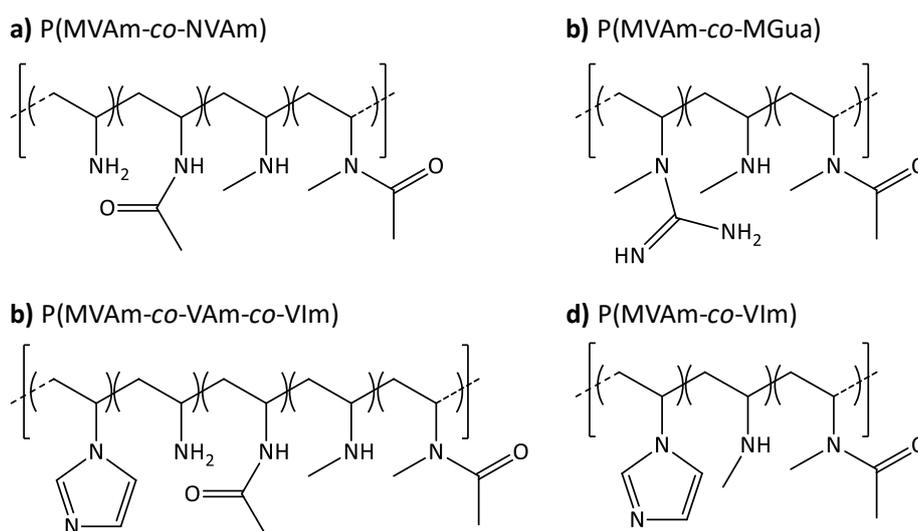


Schéma I.12 : Structures des copolymères statistiques à base de poly(N-méthylvinylamine) synthétisés par Dréan *et al.*⁹³

III.3.b.v. Les poly-L-histidine et polyvinylimidazole

Ces deux polymères sont composés de groupes imidazole (**Schéma I.11.e et f**) qui leur confèrent des propriétés intéressantes.⁹⁴ Tout d'abord, ces polymères sont biocompatibles et leurs groupements imidazole présentent une activité antimicrobienne ainsi que des propriétés tampon à un pH 6/6,5 qui correspond à leur pKa. De plus, lors de la condensation de l'ADN *via* des interactions électrostatiques, les groupes imidazole génèrent des liaisons hydrogène stabilisant d'autant plus les complexes formés. Cela a été démontré par Luck et coll.⁹⁵ qui ont travaillé, en 1976, sur des complexes formés d'ADN et de poly-L-histidine.

En 2003, une étude de Ihm *et al.*⁹⁶ communique sur l'utilisation prometteuse de P4VIm en transfert de gènes. La transfection avec ces polymères est comparable à celle de vecteurs PEI avec des cellules MC3T3E1 et est supérieure sur des cellules HeLa. De plus, une amélioration de la viabilité cellulaire est observée. De leur côté, Putnam *et al.*⁹⁷ utilisent des copolymères poly-L-histidine-polyéthylèneglycol (PHis-PEG) avec des résultats encourageants sur des cellules COS-7.

III.3.b.vi. Les dérivés de polyacrylate et polyméthacrylate

Des équipes de recherche se sont également intéressées à des monomères acrylate comportant une ou des fonctions amine. La polymérisation de ces monomères se fait plutôt par polymérisation radicalaire contrôlée donnant lieu à des polymères de structure contrôlée avec une grande variété de fonctions chimiques disponibles.⁹⁸

Nous pouvons citer les recherches de Fontaine et Pascual qui synthétisent en 2017 un copolymère à base de 2-aminoéthylacrylate (AEA) et de 2-(*N,N*-diméthylamino)éthylacrylate (DMAEA) comportant des amines quaternaires. L'originalité de ce travail réside en un phénomène de transfert de charge provoqué par une dégradation de la fonction ester, durant l'étape de transfection, générant de l'acide poly(acrylique) complètement biocompatible.⁹⁹ En 2019, ils étudient ce même copolymère lié à un bloc hydrophile PEG. Une réduction de la toxicité par rapport au même polymère non PEGylé et à la PEI linéaire 22 kDa est observée sur des cellules NIH-3T3.¹⁰⁰

III.3.b.vii. Les polysaccharides

Les principaux polysaccharides développés pour le transfert de gènes sont le chitosane et les cyclodextrines. Leur structure à base de sucre leur confère une biocompatibilité et une capacité à franchir les membranes.¹⁰¹

Les cyclodextrines sont des cycles composés de 6, 7 ou 8 unités glycopyranose liées par des liaisons osidiques $\alpha(1 \rightarrow 4)$ que l'on nomme respectivement α -, β -, γ -CD. Elles forment ainsi une cavité centrale permettant la rétention de petites molécules hydrophobes. Afin d'être utilisés en transfert de gènes, différentes équipes les ont substituées par des résidus cationiques.¹⁰² Des petites molécules telles que des aminopyridines¹⁰³ (**Schéma I.13.a**) et des acides aminés¹⁰⁴ ou des polymères tels que des PEI¹⁰⁵ (**Schéma I.13.b**) sont ainsi greffés et permettent une hausse du transfert de gènes.

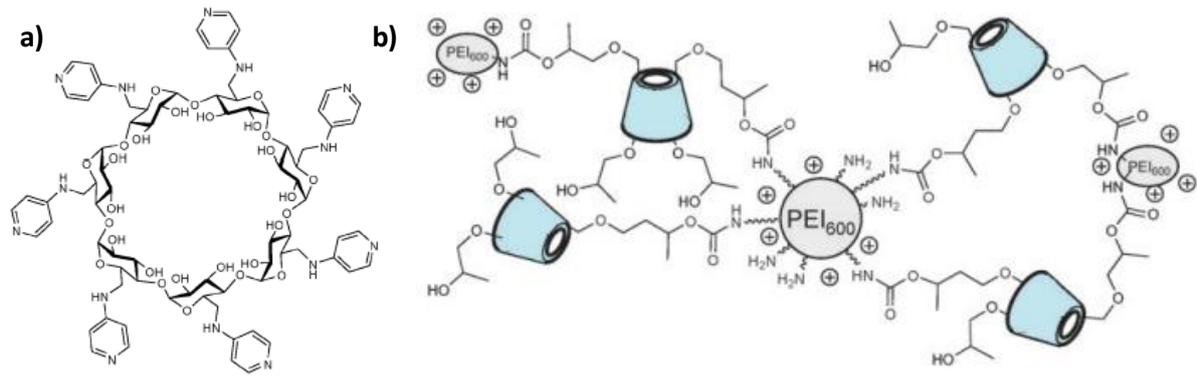


Schéma I.13: Structure de cyclodextrines modifiées : (a) heptakis(6-deoxy-6-pyridylamino)- β CD, (b) hydroxypropyl- β CD(HPCD)-PEI600.^{103,105}

Le chitosane, polysaccharide partiellement désacétylé d'origine biosourcée (carapace de crustacé principalement), se compose d'unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine liées par des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$. La récente revue de Cao *et al.*¹⁰⁶ répertorie les différentes utilisations du chitosane comme vecteur en thérapie génique. Sa faible solubilité dans des conditions physiologiques a motivé des modifications du polymère en liant, par des liaisons covalentes, des résidus hydrophiles tels que des chaînes PEGylées.¹⁰⁷ De nombreuses autres substitutions sont réalisées notamment le greffage de ligands de ciblage cellulaire comme le folate.¹⁰⁸

Partie II. Les vecteurs PEI et les stratégies d'amélioration

I. La PEI : polymère de référence en thérapie génique non-virale

I.1. Ses caractéristiques

La polyéthylèneimine est un polymère aliphatique cationique. En fonction de la stratégie de synthèse utilisée, différentes structures peuvent être obtenues : la polyéthylèneimine linéaire (*l*PEI), branchée (*b*PEI), cyclique (*c*PEI) ou en étoile (*s*PEI) (**Schéma I.14**).

Dans le cas des PEI branchées, la présence d'amines primaires, secondaires ou tertiaires de différents pK_a (4,5 pour les amines primaires, 6,7 pour les amines secondaires et 11,6 pour les amines tertiaires¹⁰⁹) confère au polymère une haute densité de charge à pH physiologique ainsi que des propriétés tampon mise en évidence par Behr et son équipe en 1995.⁴⁹

Les *l*PEI ont également des propriétés tampon entre pH 7 et 4,5¹¹⁰ et présentent une UCST (upper critical solution temperature) de 64 °C. Ainsi, il est nécessaire de chauffer la *l*PEI au-delà de 64 °C afin d'apporter une énergie suffisante pour solubiliser les chaînes polymère.¹¹¹ Néanmoins, il est important de noter que la température de cette transition de phase dépend de la masse molaire du polymère, de la concentration ainsi que du pH de la solution. Ici, la valeur de 64 °C a été déterminée pour une *l*PEI de $6,2 \cdot 10^4$ g.mol⁻¹ à une concentration massique de 2 % dans l'eau à pH neutre.

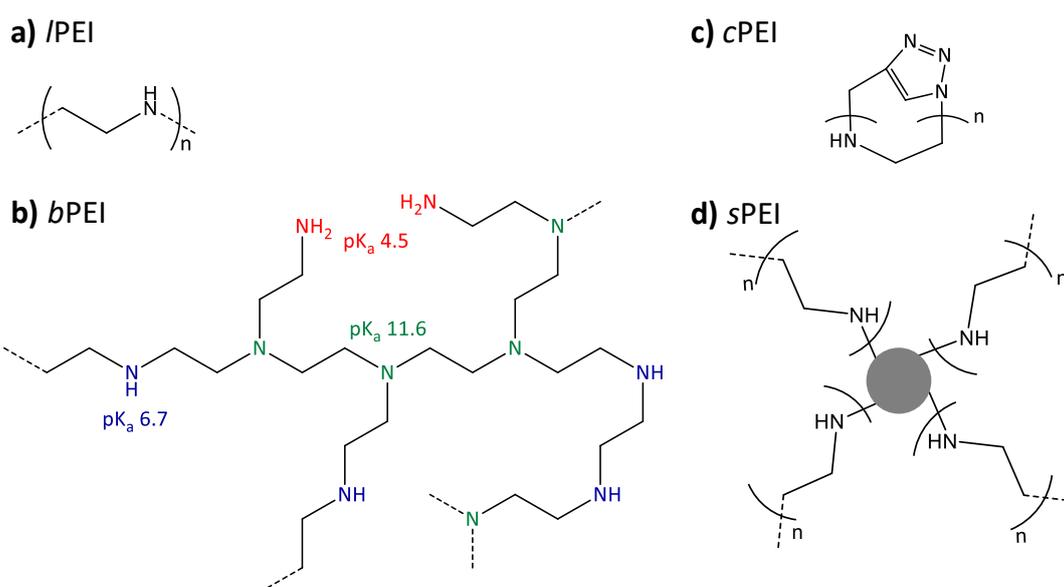


Schéma I.14 : Structures possibles de la polyéthylèneimine : (a) linéaire, (b) branchée, (c) cyclique et (d) en étoile.

La PEI trouve de nombreuses applications notamment dans les domaines de l'emballage alimentaire,¹¹² dans le processus de fabrication du papier¹¹³ ou encore dans la capture du CO₂.¹¹⁴ Mais, depuis Boussif *et al.*,⁴⁹ ce polymère est largement étudié en tant que vecteur pour la thérapie génique et est reconnu aujourd'hui comme le « gold standard » pour le transfert de gènes. Nous nous intéresserons donc dans les paragraphes suivants à sa synthèse ainsi qu'aux différentes recherches menées à son sujet dans le domaine médical.

1.2. Les stratégies de synthèse

Comme présenté précédemment, les structures de la PEI dépendent de la méthode de synthèse choisie. Ainsi la polymérisation cationique par ouverture de cycle (CROP) de l'aziridine conduit à la *b*PEI, alors que la synthèse puis l'hydrolyse de poly(2-oxazoline) permet d'obtenir des structures linéaires ou en étoiles.

1.2.a. La CROP de l'aziridine

Ce procédé, utilisé industriellement depuis 1938 en Allemagne par I.G. Farbenindustrie, permet de synthétiser des *b*PEI (**Schéma I.15.a**). Lors de cette polymérisation, l'amine secondaire de la chaîne polymère a une nucléophilie non négligeable, des réactions de transfert peuvent alors avoir lieu menant à cette structure branchée. Le ratio entre les amines primaires, secondaires et tertiaires est 1:2:1, et les molécules ont plutôt une forme sphérique en milieu aqueux.¹¹⁵ Cependant, des modifications des conditions de réaction peuvent mener à des PEI plus branchées avec un ratio 1:1:1. Enfin, au cours de cette polymérisation, l'ajout d'agent de terminaison peut permettre l'obtention de polymères de masse molaires prédéfinies. L'étude de Dick *et al.*,¹¹⁵ en 1970, propose différents agents de terminaison de type amine permettant un contrôle de la masse molaire.

Différentes équipes ont ensuite rapporté qu'il était également possible d'obtenir des *l*PEI via cette réaction. Tout d'abord, Gembitskii *et al.*¹¹⁶ réalisent la synthèse à basse température afin de diminuer les réactions secondaires et ainsi former préférentiellement de la *l*PEI. Puis, une précipitation permet de séparer les *l*PEI des *b*PEI résiduelles. Weyts et Goethals ont, quant à eux, utilisé un dérivé de l'aziridine : le 1-(tetrahydropyranyl)éthylèneimine (**Schéma I.15.b**).¹¹⁷ Ce monomère produit un polymère linéaire et l'élimination de la substitution par hydrolyse conduit à la *l*PEI désirée.

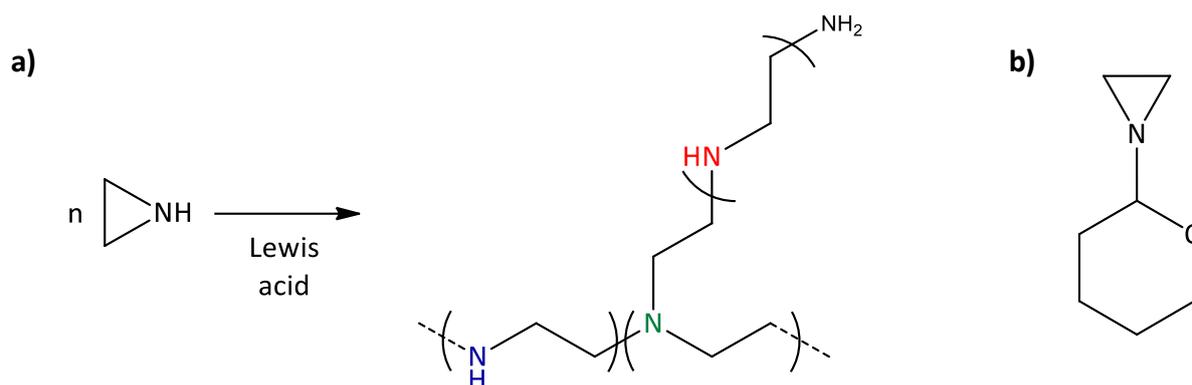


Schéma I.15 : (a) Synthèse de *b*PEI par CROP de l'aziridine, (b) le 1-(terahydropyranyl) éthylèneimine permettant la synthèse de *l*PEI.

I.2.b. La CROP de 2-alkyl-2-oxazoline et leur hydrolyse

Afin d'obtenir des PEI linéaires de structures contrôlées, une autre méthode a été développée. Une polymérisation de 2-alkyl-2-oxazolines est tout d'abord réalisée (**Schéma I.16**). Les polyoxazolines (POx) ainsi synthétisées sont ensuite hydrolysées par voie acide ou basique afin de mener aux *l*PEI correspondantes.

I.2.b.i. La synthèse des poly(2-oxazoline)s

Les 2-oxazolines ou 4,5-dihydro-oxazole en nomenclature IUPAC sont des monomères hétérocycliques à 5 atomes comprenant un atome d'oxygène et un atome d'azote. Ils ont été synthétisés pour la première fois en 1884.¹¹⁸ Néanmoins la structure n'est correctement attribuée que 5 ans plus tard par Siegmund Gabriel.¹¹⁹ Des substitutions sont possibles sur les trois atomes de carbones (2, 4 et 5). Cependant, les oxazolines les plus utilisées sont les 2-R-2-oxazolines, puisque les substitutions des positions 4 et 5 créent un encombrement stérique rendant difficile la polymérisation des monomères correspondants.

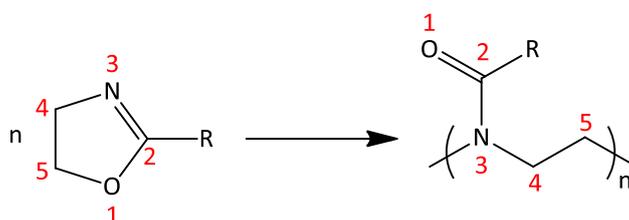


Schéma I.16 : Polymérisation des 2-R-2-oxazolines.

La polymérisation cationique par ouverture de cycle des 2-oxazolines est décrite simultanément par différentes équipes de recherche en 1966.¹²⁰⁻¹²³ Les POx sont synthétisées par une réaction de polymérisation contrôlée qui se déroule en trois étapes principales dont les mécanismes sont présentés sur le **Schéma I.17**. La notion de polymérisation contrôlée est notamment définie dans la revue de Matyjaszewski¹²⁴ en 1996. L'avantage de ces

polymérisations est l'obtention de chaînes polymère de masse molaires contrôlées avec des dispersités étroites.

Le mécanisme présente, tout d'abord, une étape d'amorçage. Le doublet non liant de l'atome d'azote du monomère attaque le carbone électrophile de l'amorceur, générant ainsi un adduit ionique (sel d'oxazolinium) en équilibre avec un adduit covalent. Une large bibliothèque d'amorceurs est aujourd'hui disponible : des amorceurs trifliques, tosylés, halogénés (halogénures d'alkyle ou d'acyle), des acides de Lewis..., les amorceurs étant monofonctionnels, difonctionnels ou multifonctionnels par exemple pour la synthèse de polymères en étoile.¹²⁵ De nombreux exemples sont répertoriés dans la revue de Guillerm *et al.*¹²⁶

La croissance des chaînes s'effectue, ensuite, soit par un mécanisme ionique, soit par un mécanisme covalent (étape de propagation). Dans le cas d'un mécanisme ionique, le monomère attaque le carbone en α de l'oxygène (carbone 5) du cycle oxazolinium entraînant un clivage de la liaison C-O (liaison 1-5), alors que dans le cas du mécanisme covalent l'attaque nucléophile du monomère a lieu sur le carbone lié à X, donnant de nouveau une extrémité oxazolinium en équilibre avec la forme covalente correspondante. L'équilibre entre les deux formes ionique et covalente dépend de la nucléophilie relative du monomère et du contre-ion X issu de l'amorceur. Différentes équipes ont déterminé l'espèce propageante prédominante selon le couple monomère/contre-ion utilisé.^{126,127} Par exemple, Saegusa *et al.*¹²⁸ ont montré que la polymérisation de la 2-méthyl-2-oxazoline avec un contre-ion tosylate se produit selon un mécanisme ionique, il en est de même avec un amorceur bromé. De plus, la vitesse de propagation varie selon le monomère et le solvant utilisé et dépend de la température de réaction. En ce qui concerne le monomère, les différents k_p apparents sont influencés par le substituant R et ont été répertoriés par Verbraeken.¹²⁷

L'étape de terminaison est, ensuite, nécessaire pour désactiver les centres actifs. Pour cela, une molécule nucléophile est ajoutée au milieu réactionnel, permettant l'introduction de différents groupes moléculaires en fin de chaîne. Les molécules les plus utilisées dans cette étape de terminaison sont la pipéridine ou une solution d'hydroxyde de potassium, nucléophiles qui réagissent très rapidement et quantitativement.¹²⁹

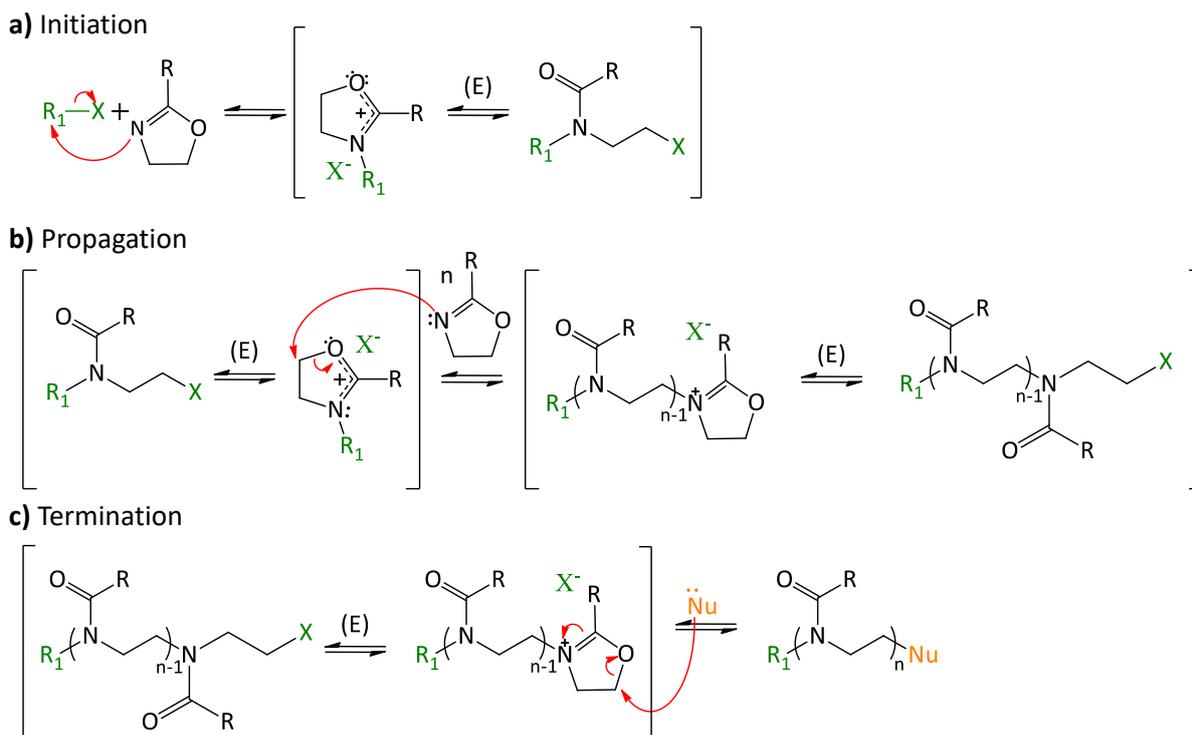


Schéma I.17 : Mécanisme réactionnel de la polymérisation de la 2-R-2-oxazoline par CROP : (a) amorçage, (b) propagation, (c) terminaison. A chaque étape, un équilibre (E) existe entre la forme cationique et la forme covalente de l'espèce en croissance. L'amorceur est composé d'un bon groupe partant (X = halogène (C, Br, I), tosylé (OTs) ou triflate (OTf= par exemple). Nu = agent de terminaison nucléophile.

Ces polymères sont très largement étudiés dans la littérature, que ce soit au sujet de leur chimie^{126,127}, de leurs propriétés¹³⁰ ou de leurs applications¹³¹⁻¹³³ notamment en biologie, grâce à leur structure de nature peptidique. Ils ont l'avantage de présenter des structures très variées selon les amorceurs, monomères et agents de terminaison choisis.

Par exemple, la nature du monomère, et plus précisément la nature du substituant R en position 2, influe sur l'hydrophilie du polymère. Comme le montre le **Schéma I.18**, un substituant méthyle rendra le polymère hydrosoluble alors qu'un monomère butyle le rendra hydrophobe. Entre ces deux extrêmes, différents monomères permettent la synthèse de polymères à LCST (lower critical solution temperature).¹³⁴ Ces polymères ont la particularité de devenir insolubles au-dessus d'une température critique à une concentration donnée. En utilisant cette propriété, la synthèse de polymères à blocs constitués de deux monomères différents conduit à des polymères amphiphiles s'auto-organisant par exemple en micelles, en fibres ou en polymersomes, en fonction de la longueur des blocs, de la concentration, de la température et du solvant.^{135,136} De plus, un monomère peut comporter un groupement fonctionnel tel qu'une chaîne insaturée¹³⁷ qui peut être utilisée en post-polymérisation.

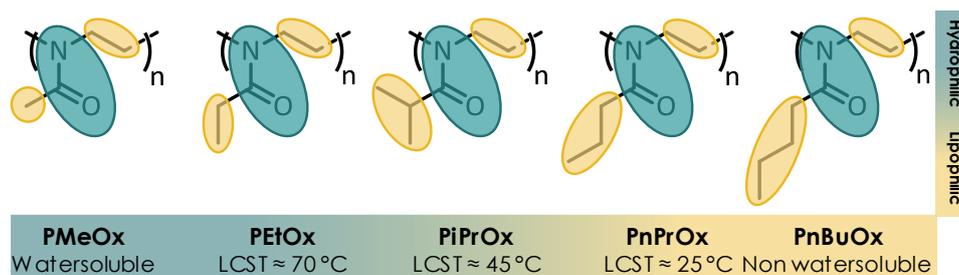


Schéma I.18 : LCST des différents poly(2-oxazolines). (PMeOx : poly(2-méthyl-2-oxazoline), PEtOx : poly(2-éthyl-2-oxazoline), PiPrOx : poly(2-isopropyl-2-oxazoline), PnPrOx : poly(2-propyl-2-oxazoline), PnBuOx : poly(2-butyl-2-oxazoline)). Adapté de¹³⁴

Les amorceurs et agents de terminaison peuvent également porter des groupements fonctionnels permettant des (post)-fonctionnalisations. Les plus utilisés sont des chaînes carbonées insaturées (alcyne/alcène), des thiols, des acides carboxyliques, des alcools ou encore des amines primaires.¹²⁶

Lors de l'utilisation d'amorceurs ou de monomères fonctionnels, une attention particulière est portée aux réactions secondaires pouvant avoir lieu et une protection adéquate est alors réalisée si nécessaire.

1.2.b.ii. L'hydrolyse des poly(2-oxazolines)

Afin d'obtenir les lPEI visées, les poly(2-oxazolines) doivent être hydrolysées. C'est en 1972 qu'apparaît la première hydrolyse de POx dans la littérature.¹³⁸ Elle est réalisée par Saegusa par voie basique. Puis, en 1979, la voie acide et sa cinétique sont étudiées par Kem.¹³⁹ Il indique qu'un thermoplastique amorphe et vitreux est obtenu en dessous de 70 % d'hydrolyse, alors qu'au-delà le polymère présente une structure cristalline qui le rend insoluble dans l'eau, dû à la régularité des chaînes en zig-zag.

L'hydrolyse des POx par voie acide ou basique sera d'autant plus aisée que le monomère oxazoline choisi est hydrophile. Hoogenboom confirme ainsi que, par la voie acide, la PMeOx s'hydrolyse plus rapidement que la PEtOx.¹⁴⁰ Les cinétiques d'hydrolyse sont linéaires en fonction du temps jusqu'à 60 % d'hydrolyse et sans influence de la masse molaire du polymère ni de la concentration en unité oxazoline, ce sont donc des réactions d'ordre zéro. Au-delà, un ralentissement est observé indépendamment de la concentration initiale en unité oxazoline. Ces cinétiques d'hydrolyse apportent des informations intéressantes afin de réaliser des hydrolyses partielles donnant lieu à des copolymères POx-co-PEI.

I.3. Son utilisation en thérapie génique

Comme mentionné précédemment, depuis son industrialisation en 1938, la polyéthylèneimine trouve de nombreux champs d'applications et suscite, en particulier, un grand intérêt dans le domaine biomédical. Elle est devenue la « gold standard » en thérapie génique non-virale et est le sujet de nombreuses recherches pour comprendre (i) son mode de transfection, (ii) son efficacité ainsi que (iii) ses limites en étudiant notamment les paramètres de masse molaire et d'architecture, cela dans le but d'optimiser sa structure et de déterminer les paramètres les plus pertinents en transfection.

I.3.a. Le mécanisme d'internalisation des polyplexes à base de /PEI

La propriété de polyélectrolyte positif de la /PEI lui permet de complexer efficacement l'ADN et il est montré que ces complexes ADN/PEI transfectent efficacement les cellules. Afin de comprendre le mécanisme d'internalisation cellulaire, un marquage sélectif de polyplexes et de protéines impliquées dans l'internalisation a été réalisé par microscopie de fluorescence.¹⁴¹ Il a été mis en évidence différents modes d'internalisation de polyplexes à base de /PEI, dont l'endocytose est le processus majoritaire. Outre le fait que l'internalisation soit cellule-dépendant, il a été mis en avant que la structure du polymère l'influçait également : un vecteur de PEI branchée entre dans les cellules HUH-7 par la voie clathrine-dépendante ou cavéole-dépendante, alors que les polyplexes de /PEI y entrent préférentiellement par un mécanisme clathrine-dépendant. Ces mécanismes ont été confirmés depuis par Midoux et coll.⁴⁷

I.3.b. L'efficacité de transfection des PEI

Afin d'améliorer l'efficacité de transfection des /PEI, l'influence de la taille du polymère a été étudiée. En 1995, Abdallah *et al.*¹⁴² ont comparé différentes /PEI de 3 masses molaires (MM) différentes : 25, 50 et 800 kDa. La /PEI de 25 kDa présente la meilleure efficacité de transfert de gènes sur le cerveau de souris adultes, alors que la /PEI de 800 kDa ne transfecte presque pas. Schubert et son équipe¹⁴³ apportent des informations supplémentaires, en 2013, en étudiant une autre gamme de masses molaires de /PEI et de *b*PEI (X_n 20, 200 et 600 soit des MM de 860, 8600 et 25800 g.mol⁻¹), complétant ainsi l'étude précédente sur une large gamme de MM. L'étude montre que la plus faible masse molaire ne transfecte pas de façon efficace pour les deux structures sur les cellules HEK. Cortez *et al.*¹⁴⁴ obtiendront le même résultat avec des *c*PEI sur des cellules HFF-1 : les trop faibles masses molaires ne sont pas efficaces. Ainsi, afin d'obtenir une bonne efficacité de délivrance de gènes, il semble nécessaire de se situer entre 3 et 25 kDa.

D'autre part, les premières expériences étaient réalisées avec des *bPEI*, puisque cette structure a été la première synthétisée. Puis, la maîtrise de la synthèse de la *lPEI* a permis son utilisation dans les applications de transfert de gènes. La discrimination des performances de la *lPEI* par rapport à la *bPEI* s'est révélée, alors, nécessaire. L'étude de Schubert, citée dans le paragraphe précédent, permet de s'intéresser à la structure de la PEI et son impact. Ainsi, les polymères linéaires transfectent avec une meilleure efficacité les cellules HEK que leurs analogues branchés ($lPEI_{600} > lPEI_{200} > bPEI_{200} > bPEI_{600}$). Ce résultat est confirmé par d'autres études notamment celle de Brissault *et al.*¹⁴⁵ qui montre que l'architecture a un impact plus important que les ratios en amines primaires, secondaires ou tertiaires ou celle d'Uduehi *et al.*¹⁴⁶ qui étudie la transfection *in vivo* de polyplexes par instillation dans les poumons de rats. L'avantage de l'utilisation de la *lPEI* 22 kDa en comparaison à des *bPEI* 25 kDa ou un lipide de type DOTAP est alors confirmé. En ce qui concerne la conformation cyclique, la transfection semble plus efficace que l'analogue linéaire.¹⁴⁴ D'après les auteurs, le résultat s'explique par une conformation plus compacte qui permet une densité de charge plus élevée.

I.3.c. La toxicité des PEI

La toxicité de la PEI seule ou des complexes à base de PEI est due à la charge cationique de ceux-ci, charge pourtant nécessaire pour la réussite du transfert de gènes. Les conditions induisant le moins de toxicité possible, tout en permettant une transfection efficace, doivent donc être établies.

Kafil *et al.*¹⁴⁷ ont analysé l'impact sur la viabilité cellulaire de PEI linéaires et branchées, libres ou complexées à de l'ADN. Ainsi, les cellules A431 présentent une viabilité plus élevée après avoir été exposées à la PEI linéaire en comparaison à la branchée puisque que l'IC50 (concentration induisant 50 % de cytotoxicité) est de 74 μg pour la *lPEI* contre 37 μg pour la *bPEI*. Cette différence est confirmée par d'autres études dont celle d'Okon *et al.*¹⁴⁸ qui compare la *lPEI* 20 kDa à des *bPEI* de 0,8 et 25 kDa. Cortez *et al.*¹⁴⁴ mettent en évidence que la *cPEI* a une toxicité comparable à celle de la *lPEI* mais moins importante que celle induite par les *bPEI* sur les cellules HFF-1 (40% pour la *cPEI* et la *lPEI* contre 60 % pour la *bPEI* à une concentration de 72 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et un ratio N/P de 10). Cependant, sur les cellules HAE, malgré un avantage considérable par rapport à la PEI branchée, la *cPEI* manifeste une toxicité légèrement plus importante que la PEI linéaire.

L'impact de la masse molaire sur la toxicité a fait l'objet de recherches de Hashida en 2003.¹⁴⁹ Différentes PEI branchées (1, 8, 10 et 70 kDa) sont utilisées pour un transfert de gènes

sur des cellules HepG2. La toxicité croît alors avec la masse molaire. La PEI de plus faible masse molaire permet ici un transfert de gènes légèrement plus efficace que celle de 10000 g.mol⁻¹, mais cette observation est associée à la viabilité cellulaire supérieure. En 2013, l'étude de Rinkenauer citée précédemment relate un résultat similaire avec des PEI linéaires et branchées. L'augmentation de la masse molaire de 860 g.mol⁻¹ à 25800 g.mol⁻¹ induit une augmentation de la cytotoxicité pour les deux structures sans réelle différence entre elles (les polymères de faibles masses molaires n'étant pas du tout toxique sur la gamme de concentration étudiée, 1 à 100 µg.mL⁻¹).¹⁴³

En conclusion, il est essentiel de trouver un juste milieu entre ces différents paramètres dans l'optique de permettre la conception de polyplexes à base de PEI les plus performants possible en limitant au maximum leurs toxicités. Les recherches se sont donc tournées vers de nouvelles générations de vecteurs à base de PEI modifiée.

II. Les stratégies d'amélioration du transfert de gènes par la PEI et leur apport

La fonctionnalisation des polymères par des ligands engendre souvent une amélioration du transfert de gènes. Plusieurs objectifs ont été proposés pouvant, dans certains cas, être complémentaires. Ainsi, la fonctionnalisation de vecteurs par des molécules de ciblage représente une stratégie universelle en nanomédecine pour « fixer » les nano-objets ou particules sur des cellules cibles d'un organe.¹⁵⁰ La fixation de composés améliorant la furtivité des polyplexes a aussi été investiguée et, enfin, des améliorations propres au transfert de gènes, telles que le greffage de composés possédant des unités tampons améliorant le relargage des polyplexes de l'endosome, ont été développées. Les stratégies de greffage de ces résidus/polymères seront d'abord présentées, puis les différents types de résidus et leurs effets seront décrits de façon à souligner les avancées les plus récentes dans le domaine du transfert de gènes.

II.1. Les différentes stratégies

II.1.a. Les sites de greffage possibles

La synthèse de PEI linéaire s'effectue aujourd'hui majoritairement par hydrolyse de poly(2-oxazoline)s. La vaste plateforme poly(oxazoline)s est une opportunité intéressante de greffage de résidus divers et variés *via* les étapes d'amorçage ou de terminaison de la

polymérisation (**Schéma I.19.a et b**).¹²⁶ De plus, l'hydrolyse des poly(oxazoline)s génère des fonctions amines secondaires, intéressantes pour le greffage de résidus fonctionnels (**Schéma I.19.c**).¹⁵¹ Enfin, lors d'une hydrolyse partielle, les motifs oxazolines résiduels sont également des lieux de couplages possibles (**Schéma I.19.d et e**).¹²⁶

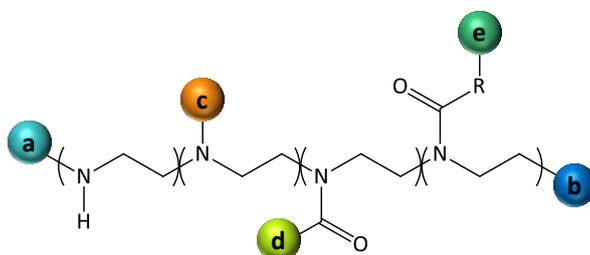


Schéma I.19 : Fonctionnalisation possibles de PEI : (a) en début ou (b) fin de chaîne par le choix d'amorceurs ou agents de terminaison pertinents, (c) par substitution de l'hydrogène du motif EI, (d) par hydrolyse partielle des motifs Ox, (e) par fonctionnalisation de monomères Ox résiduels.^{126,151}

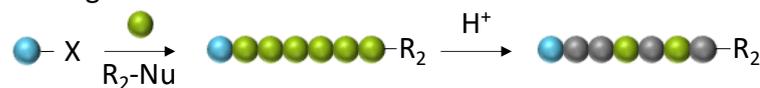
II.1.b. Les méthodes de greffage

Afin de fonctionnaliser des PEI, différentes stratégies sont rapportées : (i) l'utilisation de monomères fonctionnels (**Schéma I.20.a**), (ii) le « grafting from » qui consiste à synthétiser des polymères à partir d'amorceurs fonctionnels (**Schéma I.20.b**) et enfin (iii) le « grafting onto » qui consiste à effectuer une réaction de couplage entre les molécules d'intérêt et le polymère préalablement synthétisé (**Schéma I.20.c**).

a) Functional monomers



b) Grafting from



c) Grafting onto

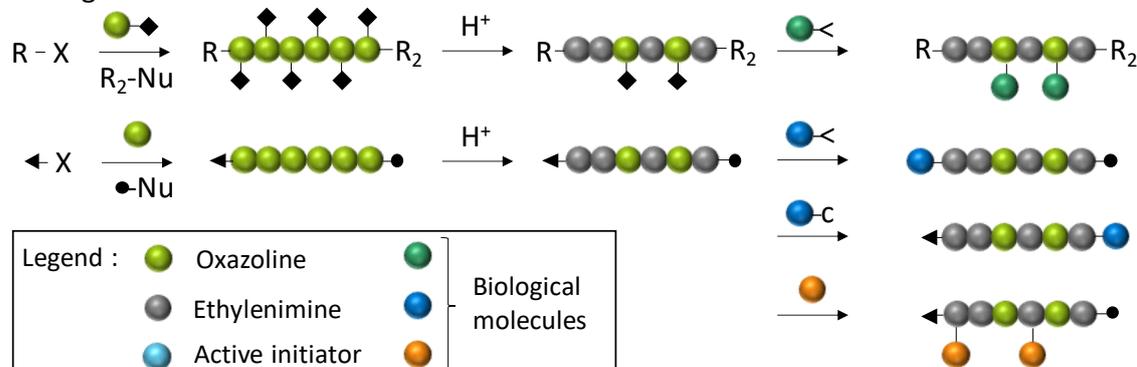


Schéma I.20 : Stratégies de fonctionnalisation des PEI par (a) polymérisation de monomères fonctionnels, (b) la méthode « grafting from » et par (c) la méthode « grafting onto ». ^{137,152-157}

II.1.b.i. Les méthodes avec monomères fonctionnels et « grafting from »

Dans ces méthodes, la polymérisation des Ox est réalisée à partir d'amorceurs (grafting from) ou de monomères portant une molécule d'intérêt telle qu'un lipide,¹⁵² un sucre¹⁵³ ou un fluorophore¹⁵⁴. Ces stratégies diminuent le nombre d'étapes de synthèse et permettent une fonctionnalisation totale et contrôlée des chaînes polymère. Cependant, les molécules biologiques sont très fréquemment sensibles. L'hydrolyse permettant l'obtention des polyéthylènimines peut ainsi détériorer ces groupements d'intérêt. La post-fonctionnalisation sera ainsi préférée malgré sa mise en œuvre plus complexe, une réaction parfois non totale et nécessitant plusieurs étapes de synthèse et de purification.

Par ailleurs, une modification peut être réalisée directement par l'introduction d'un agent de terminaison portant la molécule active lors de l'étape de terminaison de la polymérisation du monomère oxazoline. Cependant, comme précédemment, ce greffon ne devra pas être sensible à l'hydrolyse. Cette possibilité est donc peu utilisée. Elle n'est pas illustrée dans le **Schéma I.20**.

II.1.b.ii. La méthode « grafting onto »

Cette stratégie, plus utilisée dans la littérature, consiste à synthétiser dans un premier temps des POx linéaires possédant des fonctions chimiques latérales réactives, par exemple des groupements insaturés ou azide permettant de réaliser par la suite une post-fonctionnalisation par « click chemistry ». ¹³⁷

Après l'hydrolyse des chaînes POx en PEI, les molécules biologiquement actives sont greffées sur les motifs du polymère (motifs oxazoline résiduels ou éthylènimine)^{155,156} ou sur les extrémités des chaînes polymère.¹⁵⁷

II.1.c. Les réactions de couplage

Pour réaliser ces couplages post-polymérisation, une large variété de réactions chimiques peut être utilisée. Tout d'abord, différentes stratégies ont été développées en exploitant les extrémités des chaînes poly(oxazoline). La revue de Delaitre présente les principaux amorceurs ou agents de terminaison et les réactions pouvant être mises en œuvre.¹⁵⁸

Les modifications des chaînes PEI et POx sont répertoriées dans différentes revues.^{132,159,160} Pour donner un aperçu de la bibliothèque de fonctionnalisations possibles, le **Schéma I.21** présente une liste non exhaustive des réactions pouvant être effectuées sur les motifs éthylènimine.

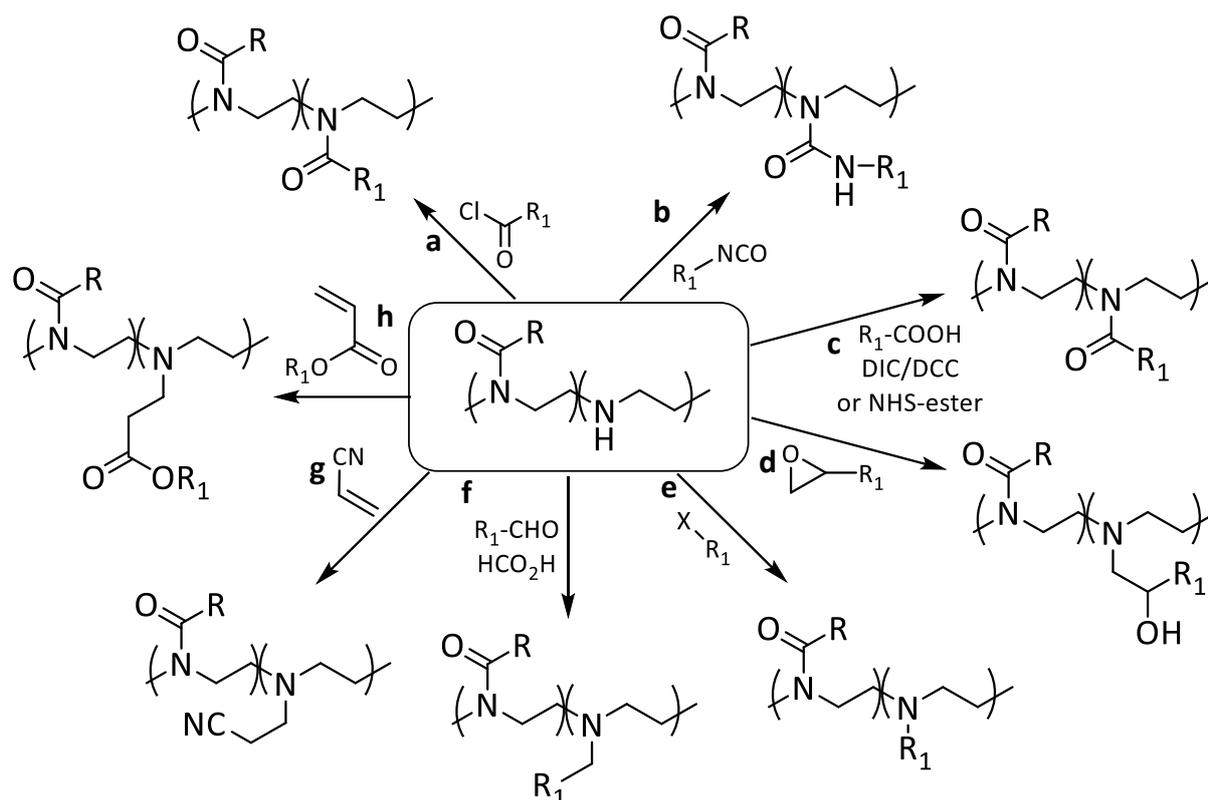


Schéma I.21 : Les différentes réactions permettant une fonctionnalisation des motifs éthylèneimine : (a) réaction avec un chlorure d'acide, (b) formation d'urée par des isocyanates, (c) couplage DIC/DCC ou NHS-ester d'un acide carboxylique, (d) ouverture de cycle d'un époxyde, (e) substitution nucléophile, (f) alkylation réductrice, (g) addition de Michael d'acrylonitriles ou (h) d'acrylates. Adapté de ^{159,160}

II.2. Les molécules d'intérêt

Grâce à ce large éventail de réactions chimiques, beaucoup de greffages ont été développés par le passé, et nous n'en ferons pas une liste exhaustive. Diverses revues listent les possibilités et les classent selon leur apport à la thérapie génique.^{151,161} Nous proposerons ici quelques exemples illustrant les modifications majeures réalisées afin de permettre (i) un ciblage cellulaire, (ii) une amélioration du transfert de gènes, ou (iii) un suivi du devenir du traitement.

II.2.a. Les ligands de ciblage cellulaire

Afin de cibler des cellules spécifiques, une reconnaissance active des polyplexes facilitant leur internalisation s'avère nécessaire. Les travaux en biologie ont permis de définir les ligands ciblant différents types cellulaires. Le **Tableau I.4** présente une liste non exhaustive de ligands, de leur récepteur et de la cellule cible.

Tableau I.4 : Différents exemples de ligands de ciblage cellulaire.

Ligand	Récepteur	Site ciblé
Galactose	Récepteur asialoglycoprotéine	Hépatocytes
Mannose	Récepteurs mannose	Macrophages, cellules dendritiques
Transferrine	Récepteurs transferrine	Cellules tumorales
Peptide contenant RGD	Intégrines	Cellules épithéliales
Facteur de croissance épidermique	Récepteur EGF	Cellules tumorales
Anticorps Anti-CD3	CD3	Lymphocytes
Peptide TAT	NA	Cellules tumorales
Peptide RGERPPR	Neuropiline-1	Cellules tumorales
Peptide CPIEDRPMC (RPM)	Récepteur du colon, Intégrine $\alpha\beta$	Cellules tumorales
N-acétylglucosamine	Récepteur de la vimentine	Cellules tumorales
Acide folique	Récepteur du folate	Cellules tumorales
Trastuzumab	Récepteur Her-2/neu	Cellules tumorales
Amide anis	Récepteur sigma	Cellules tumorales
Acide phenylbronique	Structures sialiques	Cellules tumorales
Sulfate de chondroïtine	CD44	Cellules PC-3
HA	CD44	Cellules tumorales
Acide arginine-glycine-aspartique	Intégrine	Cellules tumorales
Peptides dérivés de P53	HDM2	Cellules tumorales
Apolipoprotéine A-I	Récepteur scavenger de classe B, type I (SRBI)	Cellules tumorales
Aptamer	Molécules d'adhésion aux cellules épithéliales	Cellules tumorales
Peptide rétro-inverse	Neuropiline-1	Cellules de gliome

Afin d'illustrer l'apport de ce type de ciblage, nous pouvons citer le travail de Merkel et son équipe.¹⁵⁵ Ils reportent la synthèse d'une PEI fonctionnalisée par la transferrine (Tf-PEI) pour accentuer le transfert de gènes dans le cas de patients asthmatiques. Les récepteurs à la transferrine étant surexprimés sur les cellules responsables de la maladie, ils sont une cible d'intérêt. 1,5 molécules de transferrine (Tf) sont couplées à une PEI branchée 5kDa par une réaction de type NHS-ester (**Schéma I.21.d**) sur un greffon primaire contenant un pont disulfure (**Schéma I.22**). Sur des lymphocytes T activés primaires, les polyplexes siRNA/Tf-PEI d'une taille comprise entre 72 et 197 nm montrent une internalisation cellulaire 3,2, 4,5 et 4,1 fois plus importante que les polyplexes siRNA/PEI aux rapports N/P 10, 15 et 20 respectivement et 1,8 fois plus importante en comparaison à de la lipofectamine (produit commercial) à un rapport

N/P égal à 20. Enfin, *in vivo*, des résultats positifs sont également obtenus sur un modèle d'asthme murin. La transferrine étant surexprimée par de nombreuses cellules malignes, cette stratégie peut être appliquée dans de nombreux autres cas.¹⁶²

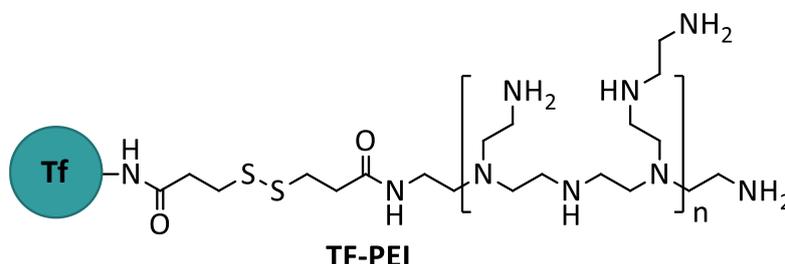


Schéma I.22 : Fonctionnalisation d'une PEI branchée par la transferrine. Adapté de¹⁵⁵

Le folate est également très utilisé en tant que ligand de ciblage cellulaire.¹⁶³ Cao *et al.*¹⁶⁴ ont récemment souligné l'avantage de ce ligand. Pour réaliser le couplage de l'acide folique sur la *b*PEI 1,8 k, deux réactions successives de N-acylation sont réalisées grâce à du EDC et NHS (**Figure I.2.a**). Des polymères présentant différents degrés de substitution sont ainsi obtenus (PEI-FA_x, x = 0,45, 0,65, 0,9, 1,25, 1,69) et testés *in vitro*.

Les polyplexes cationiques compris entre 50 et 100 nm affichent une efficacité de transfection qui, lorsque le taux de fonctionnalisation est faible (0,45 ou 0,65), est supérieure de plusieurs ordres de grandeur à celle de la *b*PEI 1,8 k non fonctionnalisée sur différentes lignées cellulaires (cellules Hela, A549 et KB). Puis, celle-ci décroît avec l'augmentation du taux de fonctionnalisation pour atteindre le niveau initial de la *b*PEI 1,8 k. Les faibles taux de fonctionnalisation (0,45 et 0,65) révèlent une transfection égale à celle de la *b*PEI 25 k de référence (**Figure I.2.b**). Nous pouvons notamment comparer les pourcentages de cellules transfectées par les polyplexes PEI-FA_{0,65} et PEI 25 k qui sont respectivement de 18,5 % et 17,78 % dans les cellules KB.

La meilleure efficacité de transfection des polyplexes les moins substitués par rapport à ceux plus substitués a été attribuée à plusieurs paramètres : une meilleure capacité de liaison à l'ADN_p, l'obtention de polyplexes plus petits, un meilleur effet tampon et enfin un potentiel zêta supérieur. L'identification de l'effet d'un seul paramètre dans ce type d'étude est pratiquement impossible, mais la stratégie de fonctionnalisation reste intéressante.

En ce qui concerne la cytotoxicité de ces polyplexes, la viabilité cellulaire est croissante avec le degré de substitution mais est moins importante que les complexes à base de PEI 1,8k non modifiée. En comparaison avec la PEI 25k, ils restent néanmoins tous moins toxiques pour

les cellules. Il est donc nécessaire de combiner les résultats de transfection et de cytotoxicité afin d'utiliser le meilleur polyplexe.

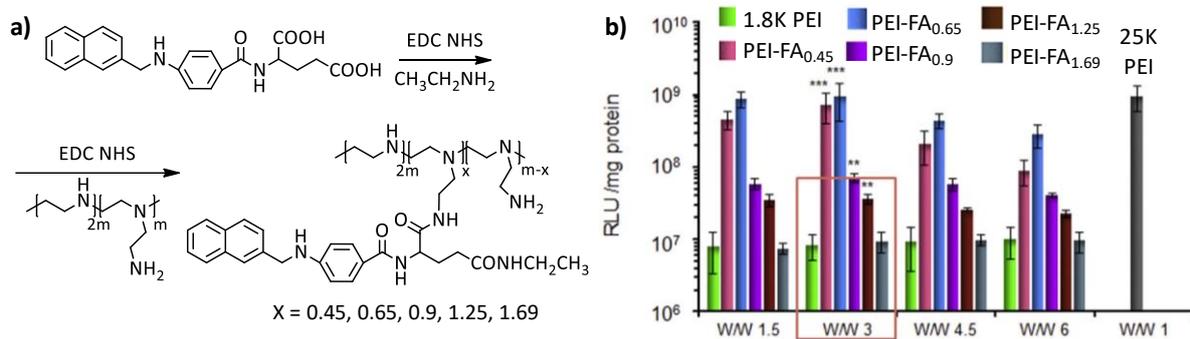


Figure I.2 : (a) Schéma réactionnel de la synthèse des PEI-FA et (b) expression de la luciférase des polyplexes PEI-FA_X/pLUCI à différents ratios massiques dans les cellules KB avec les témoins 1,8K PEI/pLUCI et 25k PEI/pLUCI (à leur rapport massique optimal). Adapté de¹⁶⁴

Ainsi, ces ligands cellulaires qui peuvent être très variés offrent une possibilité d'amélioration de l'internalisation cellulaire et donc une augmentation de la transfection. De plus, *in vivo*, ce ciblage spécifique permet de diminuer l'internalisation par les cellules non-cibles et ainsi de transfecter préférentiellement les cellules souhaitées.

II.2.b. Les fonctionnalisations spécifiques du transfert de gènes

Lorsque l'on parle de transfert de gènes, les différentes étapes intracellulaires sont spécifiques à celui-ci et différentes par rapport aux nanomédicaments transportant une molécule anticancéreuse par exemple. Afin d'améliorer la transfection, les recherches ont développé des fonctionnalisations pour faciliter les différentes étapes intracellulaires. Les objectifs de ces fonctionnalisations, présentées ci-après, peuvent être (i) d'améliorer l'échappement de l'endosome, (ii) diminuer la toxicité des vecteurs, (iii) faciliter le transport dans le cytosol, ou (iv) l'entrée dans le noyau. Cette présentation montrera les principales modifications réalisées et ne se veut pas exhaustive.

II.2.b.i. L'échappement de l'endosome

L'échappement de l'endosome est une étape importante pour la transfection. En effet, si les polyplexes ne sont pas relargués/libérés avant la maturation de l'endosome, ils seront détruits par les lysosomes et la transfection n'aura pas lieu.

Ainsi, dans cet objectif, Bertrand *et al.*¹⁶⁵ ont greffé des molécules d'histidine sur des chaînes PEI (His-PEI). L'histidine, connue pour son effet d'éponge à protons grâce au motif imidazole et son pKa situé à 6,8, est greffée sur les motifs EI par une addition de Michael (**Schéma I.23**) et accroît ainsi la libération des polyplexes des endosomes dans le cytosol et

donc l'expression du gène véhiculé. L'effet tampon des polymères modifiés augmente avec le taux de greffage des motifs histidine jusqu'à 24 % puis diminue au-delà dû à l'introduction d'amines tertiaires. De plus, ces taux de modification élevés augmentent la gêne stérique, au détriment d'une complexation correcte de l'ADN, et ne permettent donc pas la formation des polyplexes. Le transfert de gènes sur des cellules HeLa est amélioré et la cytotoxicité diminuée par comparaison à des PEI non modifiés avec les meilleurs résultats obtenus pour un taux de modification compris entre 2 et 24 % et à un ratio massique polymère/pDNA 6/1. Il a été, ainsi, montré qu'une modification de 16 % des motifs EI permettait un compromis acceptable entre efficacité et cytotoxicité. L'utilisation de l'histidine est aujourd'hui répandue afin d'améliorer l'effet tampon des polyplexes à base de PEI.

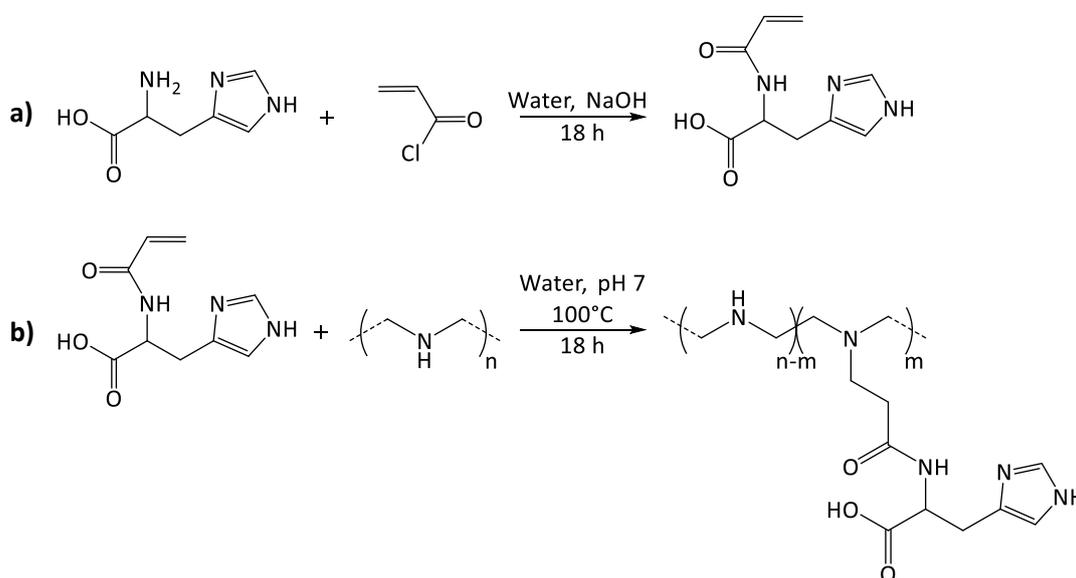


Schéma I.23 : Synthèse de la His-PEI : (a) synthèse de l'N-acryloyl-histidine par une réaction d'addition-élimination et (b) synthèse de la His-PEI par addition de Michael. Adapté de¹⁶⁵

Nous pouvons citer également l'apport de l'acide urocanique qui comporte un groupement imidazole étudié en 2015 par Ihm *et al.*¹⁶⁶ Leurs tests *in vitro* sur cellules HeLa et Cos-7 et *in vivo* sur souris mettent en évidence une meilleure viabilité cellulaire et une augmentation de la transfection.

Les molécules permettant d'augmenter le pouvoir tampon du polymère ont ainsi un grand intérêt permettant une meilleure efficacité de transfection grâce à un échappement de l'endosome plus important.

II.2.b.ii. La toxicité des vecteurs

Une des limitations des vecteurs PEI est leur toxicité cellulaire due à leur charge cationique. Afin d'augmenter la biocompatibilité, des résidus hydrophobes menant à des PEI

amphiphiles comme du pluronic (polymère tribloc poly(éthylène glycol)-*b*-poly(propylène glycol)-*b*-poly(éthylène glycol)) ou des chaînes alkyle peuvent être couplées.¹⁶⁷ Des molécules biodégradables telles que le chitosane,¹⁶⁸ le dextrane¹⁶⁹ ou encore des cyclodextrines¹⁷⁰ ont également donné des résultats intéressants. Enfin, nous pouvons citer Oskuee *et al.*¹⁷¹ qui ont greffé des chaînes alkyle courtes terminées par un groupe carboxylate.

La synthèse de PEI dégradable est une autre stratégie pouvant réduire sa toxicité. Pour cela, des PEI de faibles masses molaires sont réticulés avec des liaisons clivables telles que des esters ou des ponts disulfures. Ces liaisons pH-sensibles dans les conditions physiologiques mènent à la destruction du polyplexe et ainsi au relargage du matériel génétique. Les polymères résultants sont donc de faibles masses molaires et donc moins toxiques. Cho et coll.¹⁷² ont répertorié les différentes liaisons pouvant être utilisées pour synthétiser ces PEI dégradables et leur application en thérapie génique.

II.2.b.iii. Le transport dans le cytosol

Après le relargage dans l'endosome, le plasmide doit encore être véhiculé dans le cytosol pour rejoindre le noyau comme expliqué précédemment. Afin de faciliter cette étape, les recherches ont développé le greffage de peptides permettant un transport actif dans le cytosol. Par exemple, les peptides NLS (nuclear localization sequence) reconnus par des protéines de transport¹⁷³ ou encore des peptides exploitant la dynéine, protéine motrice des microtubules,¹⁷⁴ sont utilisés. Ces greffages peuvent être réalisés sur le polymère ou sur le plasmide, les recherches n'ayant pas clairement défini si l'ADN était transporté sous forme de complexe ou seul après son échappement de l'endosome. Ces modifications permettent une accumulation périnucléaire du matériel génétique.

II.2.b.iv. L'entrée dans le noyau

Pour finir, la capture nucléaire peut être facilitée par la modification des complexes. Par exemple, le greffage de peptides NLS cité précédemment permet, en plus d'un transport actif, d'augmenter l'entrée dans le noyau.

II.2.c. Les modifications permettant un diagnostic

Pour terminer, la synthèse de vecteurs théranostiques combinant donc traitement et traçage des particules dans le corps s'est révélée intéressante afin de mettre en lumière les différentes étapes de la transfection, d'avoir un suivi de l'accumulation dans les tissus cibles ou, dans le cas de cancer, de localiser des cellules tumorales. Des chromophores organiques ou

des particules inorganiques ont été couplés à des PEI dans ce but. Une sélection des modifications les plus courantes est présentée ici.

II.2.c.i. Les fluorophores organiques

Le couplage d'un chromophore (active two-photon excited fluorescent (TPEF) chromophore) pouvant être localisé par microscopie par excitation à deux photons (M2P) a, par exemple, été réalisé par l'équipe de Mély en 2007.¹⁷⁵ Le fluorophore fonctionnalisé par des motifs isothiocyanate est couplé aux fonctions amine primaire d'une bPEI 25k. Une substitution de 2,6 % de ces amines, correspondant à 15 chromophores par chaîne polymère, a été obtenue. Ils ont mis en évidence la complexation de l'ADN par cette PEI modifiée, avec conservation des propriétés physiques du chromophore. Ce greffage ne manifeste aucun impact significatif sur les cellules HeLa. La formulation de polyplexes mixant des polymères fluorescents à des polymères non fluorescents à un ratio 1/3 s'est révélée plus efficace que les complexes formulés avec uniquement des polymères fluorescents. En effet, les polyplexes sont plus petits avec ce mélange de polymères et ont ainsi un diamètre proche de celui des polyplexes non fluorescents. La même équipe a réalisé un travail similaire avec un fluorophore à base de rhodamine (isothiocyanate de tétraméthylrhodamine).¹⁷⁶

D'autres types d'expériences mettant en jeu des sondes fluorescentes peuvent être utilisés comme la spectroscopie de fluorescence à résolution temporelle¹⁷⁷ ou la fluorescence de transfert d'énergie par résonance (FRET). L'équipe de Patrick Midoux a, ainsi, préparé deux formulations différentes de polyplexes avec des ADN ρ fluorescents vert (fluorescéine) et rouge (cyanine-5) respectivement.¹⁷⁸

L'utilisation de ces fluorophores rend possible la visualisation de l'endocytose, l'échappement de l'endosome ainsi que l'accumulation périnucléaire des vecteurs ainsi formulés. Mély a notamment mis en évidence une accumulation des vecteurs dans les endosomes et dans le noyau avec des concentrations, respectivement, 30 et 2,5-3,5 fois supérieures à la concentration extracellulaire. Cela suggère également l'entrée du vecteur complet dans le noyau et non pas uniquement du matériel génétique véhiculé dans une expérience *in vitro* sur cellules non quiescentes. De son côté, Midoux expose que le mélange des formulations fluorescentes mène à des échanges d'ADN ρ entre polyplexes. Cette réorganisation entre les polyplexes dépend de la force d'interaction ADN/polymère : plus celle-ci est importante, moins les échanges ont lieu.

II.2.c.ii. Les particules inorganiques

Une autre catégorie de modification de PEI permettant un diagnostic est le greffage de particules inorganiques. La revue de Knipe *et al.*¹⁷⁹ de 2013 résume les avancées du suivi spatio-temporel des vecteurs de gènes *via* l'utilisation de ces particules. Ainsi, l'incorporation de nanoparticules d'oxyde de fer super paramagnétiques (SPION),¹⁸⁰ d'or¹⁸¹ ou encore de quantum dots¹⁸² permet la conception de vecteurs théranostiques non invasifs.

Ces particules inorganiques, en plus de leur fluorescence qui permettent un suivi des polyplexes, peuvent également améliorer la transfection par ciblage assisté. Par exemple, les nanoparticules magnétiques sont des agents efficaces pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et offrent également une méthode efficace de délivrance de gène lorsque qu'un champ magnétique est utilisé afin de concentrer les nanoparticules au niveau des cellules cibles.

En résumé, l'utilisation de polyplexes théranostiques permet une compréhension élargie des événements occurrents lors du transfert de gènes. Ces outils amènent, ainsi, des réponses importantes qui permettent de mieux diriger les recherches de demain.

Pour conclure sur ces nombreuses modifications, la PEI est un polymère offrant une large possibilité de fonctionnalisation. De plus, comme souligné par Jiang *et al.*,¹⁵¹ une combinaison pertinente de ces nombreuses et différentes fonctionnalisations est importante afin de mettre au point les vecteurs à base de PEI les plus performants possibles liant une biocompatibilité et une transfection de gènes maximales.

Il existe de multiples combinaisons de ces fonctionnalisations. Pour exemple, très récemment, Merkel *et coll.*¹⁸³ ont publié un bilan de leurs recherches à propos de polyplexes pour l'asthme. Ils combinent un ligand de reconnaissance cellulaire, la transferrine, avec un ligand permettant une amélioration du relargage de l'endosome, la méltittine. Ces polyplexes véhiculant des siRNA affichent une hausse du transfert de gènes en comparaison aux complexes ne possédant que la transferrine ou aux complexes non modifiés.¹⁸⁴

II.3. La PEGylation

II.3.a. Le principe de la PEGylation

La PEGylation est une technique couramment utilisée depuis plusieurs décennies afin d'améliorer l'efficacité des nanomédicaments. Le poly(éthylène glycol) possède de nombreuses propriétés d'intérêt pour le biomédical : il est miscible avec beaucoup de solvants et présente une très bonne biocompatibilité due à sa non-immunogénicité, sa non-cytotoxicité et sa non-antigénicité. Ainsi, il est qualifié de polymère « furtif » (qui n'est pas détecté), c'est-à-dire qu'il empêche la reconnaissance du traitement médical par le système immunitaire et prévient ainsi l'agrégation, l'opsonisation et la phagocytose des nanoparticules. Le temps de circulation du médicament PEGylé et sa biodisponibilité sont donc augmentés.¹⁸⁵

Ce polymère hydrophile a dévoilé ses capacités pour la première fois en 1977. Davis et coll.¹⁸⁶ le greffent de façon covalente à une enzyme de foie bovin et rapportent le bénéfice de ce greffage sur le temps de circulation des enzymes modifiées administrées par voie systémique chez des lapins et sans observation d'une réponse immunitaire. Il est ensuite approuvé par la FDA avec le 1^{er} médicament PEGylé, Adagen®, en 1990. Depuis, de très nombreuses recherches l'utilisent afin de rendre furtif les différents traitements développés.¹⁸⁷

II.3.b. La PEGylation en transfert de gènes

En transfert de gènes, la PEGylation est utilisée notamment pour réduire la cytotoxicité du traitement et apparaît largement dans les recherches de thérapie génique.¹⁸⁸ Cependant, la question de la conservation d'une bonne efficacité de transfection se pose après avoir recouvert les nanoparticules de ce polymère furtif. C'est pourquoi des études ont été réalisées afin de définir les meilleurs paramètres, en ce qui concerne la masse molaire et le taux de greffage des chaînes PEG sur des vecteurs synthétiques, pour profiter de ses propriétés intéressantes, sans détériorer la transfection. Nous nous intéresserons, ici, au greffage de chaînes PEG sur des polyplexes à base de PEI mais cela est également utilisé pour les autres vecteurs non-viraux.

Zhang *et al.*,¹⁸⁹ en 2007, apportent des informations en ce qui concerne le taux de greffage et la masse molaire des chaînes PEG. La synthèse de copolymère PEG-*g*-PEI est réalisée, avec la méthode « grafting onto », en couplant du diisocyanate d'isophorone (IPDI) à un PEG-OH puis à une *b*PEI 25k (**Figure I.3.a**). Une bibliothèque de six copolymères a été synthétisée avec deux PEG de masses molaires différentes, 2 et 5 k, à trois taux de couplage, 1/9, 1/3 et 1/1 w/w PEG/PEI. D'après les analyses de diffusion de la lumière, la taille des

complexes PEG-PEI/pDNA diminue avec l'augmentation de la masse molaire et du taux de greffage de PEG (**Figure I.3.b**). Le potentiel zêta décroît également, tout en restant positif. En ce qui concerne la toxicité, l'apport positif du PEG est confirmé : la viabilité des cellules HeLa augmente avec le taux de greffage, sans réelle influence de la masse molaire du PEG. Enfin, l'efficacité de transfection (**Figure I.3.c**) indique qu'un taux de greffage trop important ou une trop longue chaîne PEG est néfaste au transfert de gènes. Cette diminution est notamment justifiée par une moins bonne condensation de l'ADN et donc une dissociation de celui-ci avant l'internalisation, lorsque le taux de greffage est élevé. Cela pourrait également être justifié par la diminution du potentiel zêta qui entraîne une diminution des interactions cellules/complexes. Néanmoins, il est important de noter qu'à un ratio N/P de 50, le résultat inverse est obtenu, puisqu'une meilleure transfection est observée en augmentant le taux de greffage ou la masse molaire de la chaîne PEG. Enfin, le PEG_{2k}-PEI à un taux de greffage 1/9 (PEG-PEI(2-25-1)) avec un rapport N/P 30 s'est révélé le plus efficace et présente un transfert de gènes supérieur à celui de la PEI non greffée. Les mêmes conclusions ont également été formulées par Smith *et al.*¹⁹⁰ Cependant, la furtivité des complexes est supposée dans ces études : il n'y a pas d'expériences démontrant une diminution de l'interaction avec les protéines sériques en présence de PEG.

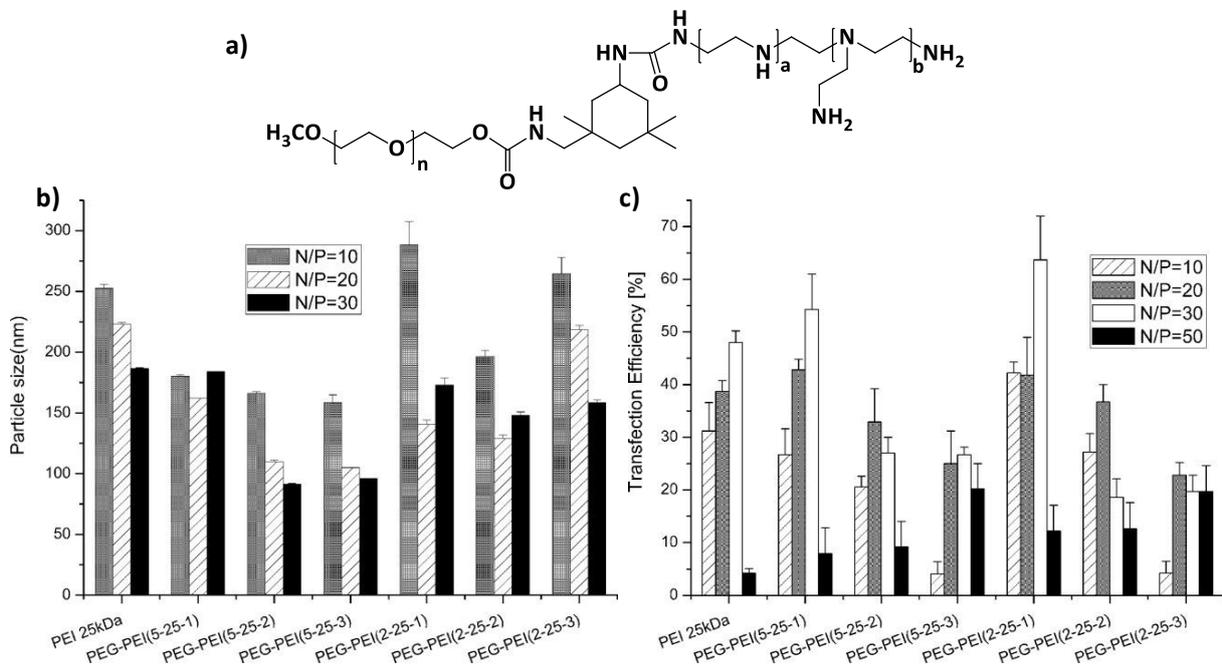


Figure I.3 : (a) Structure des PEG-PEI synthétisés, (b) tailles des complexes formés et (c) efficacité de transfection des complexes en fonction du polymère et du ratio N/P utilisés. (PEG-PEI(X-P-Q) : X = masse molaire en kDa du bloc PEG, P = masse molaire en kDa du bloc PEI, Q = taux de greffage de PEG avec 1 = 1/9, 2 = 1/3, 3 = 1/1).

D'autre part, dans une publication de Brissault *et al.*,¹⁹¹ un copolymère PEG-*l*PEI_{22k} a été synthétisé par la méthode « grafting from ». Une polymérisation par CROP de la 2-éthyl-2-oxazoline et de la 2-méthyl-2-oxazoline a été réalisée à partir d'un macroamorceur CH₃-PEG_{2k}-tosylate (CH₃-PEG-Ts), puis une hydrolyse basique a permis de parvenir au polymère cible, c'est-à-dire un copolymère d'architecture linéaire PEI-*b*-PEG. Les complexes obtenus avec ce copolymère et un ADN_p sont de taille comparable à celle des complexes non PEGylés et avec un potentiel zêta positif. Ils obtiennent un transfert de gènes efficace sur deux lignées cellulaires, HepG2 et HEK293, à la hauteur de la *l*PEI 22 k tout en bénéficiant d'une toxicité moindre.

La synthèse des copolymères PEG-PEI par les méthodes « grafting from » ou « grafting onto » est donc possible et offre, dans les deux cas, la diminution de la toxicité des complexes. Cependant, il est nécessaire de réfléchir à une solution afin de contrebalancer la perte de transfection observée avec des taux de PEGylation élevés. De plus, des expériences démontrant la furtivité supposée des complexes seraient judicieuses.

C'est dans ce but que des études couplent ce greffage avec d'autres ligands comme ceux présentés précédemment. Il serait impossible d'être exhaustif ici, mais le travail de Luo *et al.*¹⁹² en 2017 est une illustration intéressante de ces fonctionnalisations multiples. La PEI est fonctionnalisée *via* un pont disulfure (SS) par des chaînes PEG portant un ligand de reconnaissance cellulaire, le folate (FA) à leurs extrémités. Les polyplexes multifonctionnels ont été réalisés avec le polymère FA-PEG-SS-PEI, des nanoparticules d'oxyde de fer super paramagnétiques (SPION) et du siRNA. Sur des cellules SCG-7901, ces vecteurs présentent une biocompatibilité supérieure à celle de la lipofectamine commerciale jusqu'à un N/P de 30. L'efficacité de transfection est également meilleure que la référence, pour des N/P de 10 et 20 (en dessous, une mauvaise complexation diminue la transfection ; au-dessus elle n'a pas été testée), et une meilleure internalisation des nanoparticules comportant la modification avec l'acide folique est observée grâce à la localisation des particules SPION.

Nous pouvons noter un avantage subséquent à ce greffage qui offre un effet espaceur. En effet, le greffage de ces chaînes hydrophiles et mobiles en surface offre un espacement du cœur de la nanoparticule qui peut être utile lors de l'utilisation de récepteurs membranaires, ceux-ci étant alors plus accessibles. Par exemple, l'étude de Guo et Lee¹⁹³ s'intéresse à des vecteurs PEI fonctionnalisés par du folate. Les vecteurs PEI-Folate transfectent les cellules KB au même niveau que les complexes non modifiés. Mais, dans le cas de vecteurs PEI-PEG-

Folate, la transfection est renforcée grâce à une meilleure disponibilité du ligand permettant ainsi une reconnaissance cellulaire accrue.

Enfin, l'avantage de la PEGylation a également été démontré *in vivo* notamment par Wagner et coll.¹⁹⁴ Une augmentation du temps de circulation chez la souris est observée avec des nanoparticules PEGylées en comparaison à des nanoparticules non-PEGylées.

II.3.c. Les limites de la PEGylation

Cependant, malgré son apport bénéfique dans le domaine des nanomédicaments, ces dernières années ont vu apparaître de nombreuses études démontrant que la PEGylation provoquait tout de même des réactions immunogènes défavorables. Nous pouvons notamment citer les revues des équipes de Schubert, Jiang ou encore Lai.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ En effet, des injections successives de nanoparticules PEGylées ont manifesté une accélération du phénomène de clairance rénale due à la présence d'anticorps anti-PEG. La première injection active la synthèse de ces anticorps, puis les injections suivantes sont reconnues et déclenchent alors le système immunitaire.¹⁹⁸ De plus, l'utilisation de PEG dans les produits alimentaires et cosmétiques nous expose à celui-ci avant l'administration du traitement PEGylé et peut alors déclencher la production d'anticorps avant la première injection du traitement. Enfin, une accumulation possible dans les tissus peut créer une toxicité dans le cas d'un traitement de longue durée en milieu physiologique.¹⁹⁹

C'est pourquoi les recherches se tournent, aujourd'hui, vers de nouvelles solutions dans le but de trouver d'autres polymères biocompatibles permettant d'induire une furtivité des nanoparticules plus sûre.²⁰⁰

II.3.d. Les alternatives à la PEGylation

Parmi ces alternatives, nous trouvons différents polymères biocompatibles tels que les poly(2-oxazoline)s, polyglycérols, polyvinylpyrrolidone, polyacrylamines ou encore les polymères zwitterioniques, notamment à base de sulfobétaïne. L'utilisation de polypeptides ou de polysaccharides est également répertoriée (**Schéma I.24**). Une analyse des différentes méthodes est proposée par Anilkumar²⁰¹ et semble indiquer que ces alternatives permettront de surmonter les inconvénients liés à la PEGylation. Néanmoins, parmi les polymères synthétiques, uniquement la poly(2-éthyl-2-oxazoline) est accepté en tant qu'additif pour l'industrie agroalimentaire par la FDA. Ce même polymère est également le sujet d'une étude clinique aux USA dans le cadre d'une application pour la maladie de Parkinson menée par la

société Serina Therapeutics. Cette demande pour un nouveau médicament expérimental (*investigational new drug* – IND) a été approuvée par la FDA en 2016.²⁰²

Dans le cadre de la thérapie génique et plus spécifiquement de la thérapie génique non-virale, l'utilisation des polyoxazolines, polymères neutres, stables, hydrophiles, facilement fonctionnalisables et dont la biocompatibilité a été démontrée,^{203,204} semble une solution pertinente. En effet, les vecteurs les plus prometteurs étant composés de PEI, polymères principalement obtenus à partir de précurseurs polyoxazolines, la POxylation est une solution simple à mettre en œuvre dans le domaine de la thérapie génique (Partie III).

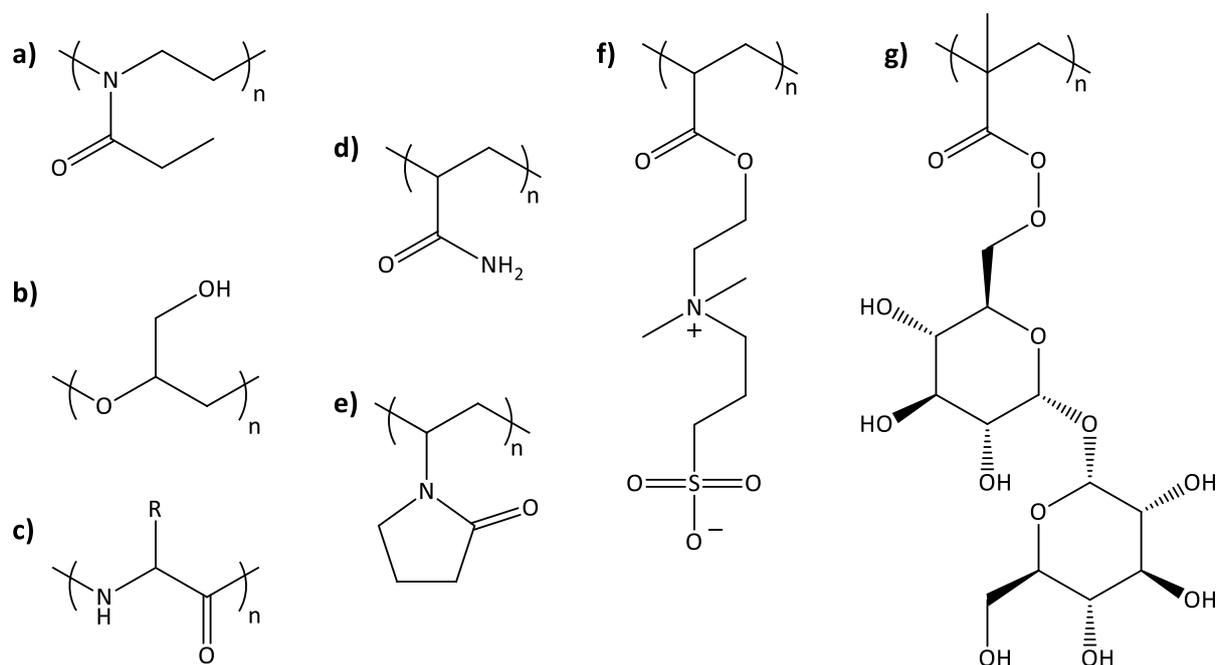


Schéma I.24 : Différentes alternatives à la PEGylation : (a) poly(2-éthyl-2-oxazoline), (b) polyglycérol, (c) polypeptide, (d) polyacrylamide, (e) polyvinylpyrrolidone, (f) polymère zwitterionique et (g) systèmes à base de sucres. Extrait de²⁰⁰

Pour conclure cette partie sur les vecteurs à base de PEI, leur étude souligne des résultats prometteurs. Ce polymère accessible par différentes voies de synthèse selon la structure désirée doit, néanmoins, être fonctionnalisé pour faciliter le transfert de gènes et diminuer les réactions du système immunitaire. La fonctionnalisation peut se faire *via* de nombreuses réactions chimiques et a été largement étudiée. Cependant, une alternative à la PEGylation nécessite d'être développée notamment grâce à la POxylation. Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons, ainsi, aux différents résultats obtenus en thérapie génique avec des copolymères PEI-POx comme alternative aux PEI-PEG.

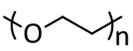
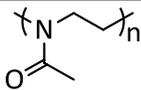
Partie III. Les copolymères PEI-POx

I. La POxylation *versus* la PEGylation

En 1989, Goddart publie la première étude de biocompatibilité des POx et plus précisément de la poly(2-méthyl-2-oxazoline).²⁰⁵ Puis, Zalipsky *et al.*²⁰⁶ utilisent, en 1996, la POxylation comme alternative à la PEGylation, en prouvant que l'augmentation du temps de circulation de liposomes greffés avec des chaînes PMeOx et PEtOx est similaire à des chaînes PEG. Depuis, de nombreuses revues ont été publiées sur les POx et leurs applications biologiques.^{199,203,207}

Les propriétés biologiques du PEG et de la PMeOx sont comparées dans le **Tableau I.5**.

Tableau I.5 : Propriétés biologiques du PEG et de la PMeOx.^{199,208,209}

Polymères	PEG	PMeOx
Structure		
Solubilité	Hydrophile	Hydrophile
LD50	> 2 g.kg ⁻¹	> 4.0 g.kg ⁻¹
Toxicité	Accumulation dans les organes possible	Facilement éliminé

Outre leurs solubilités dans l'eau, nous remarquons que la PMeOx est mieux tolérée par l'organisme avec une DL50 (dose létale médiane) supérieure à celle du PEG et son élimination se révèle plus aisée.

De plus, concernant leurs synthèses, les poly(éthylène glycol)s ne peuvent être fonctionnalisés que par leurs extrémités de chaîne alors que, dans le cas des poly(2-oxazoline)s, de nombreuses stratégies de fonctionnalisation des fins de chaîne et du squelette sont possibles.

Afin de permettre une furtivité des nanoparticules, il est important de noter que les polyoxazolines utilisées doivent être solubles dans l'eau à la température du corps humain soit 37°C. Ainsi, les monomères oxazoline pouvant être utilisés pour la POxylation sont la 2-méthyl, 2-éthyl et 2-isopropyl-2-oxazoline car la LCST des autres POx est trop faible (**Schéma I.18**).

Dans la suite de cette partie, nous nous intéresserons à l'utilisation de la POxylation comme alternative à la PEGylation dans le domaine de la thérapie génique. Tout d'abord, les

méthodes de synthèses possibles des POx-PEI seront exposées puis nous nous focaliserons sur les POx-PEI de type copolymères à blocs doubles hydrophiles (DHBCs).

II. Les méthodes de synthèse

Sur le même principe que le couplage de ligands, différentes techniques sont utilisées pour obtenir des copolymères PEI-POx. Les deux solutions possibles sont, d'une part, le couplage covalent d'une chaîne POx et d'une chaîne PEI (**Schéma I.25.a**), et, d'autre part, l'hydrolyse de POx précurseurs de PEI (**Schéma I.25.b**).

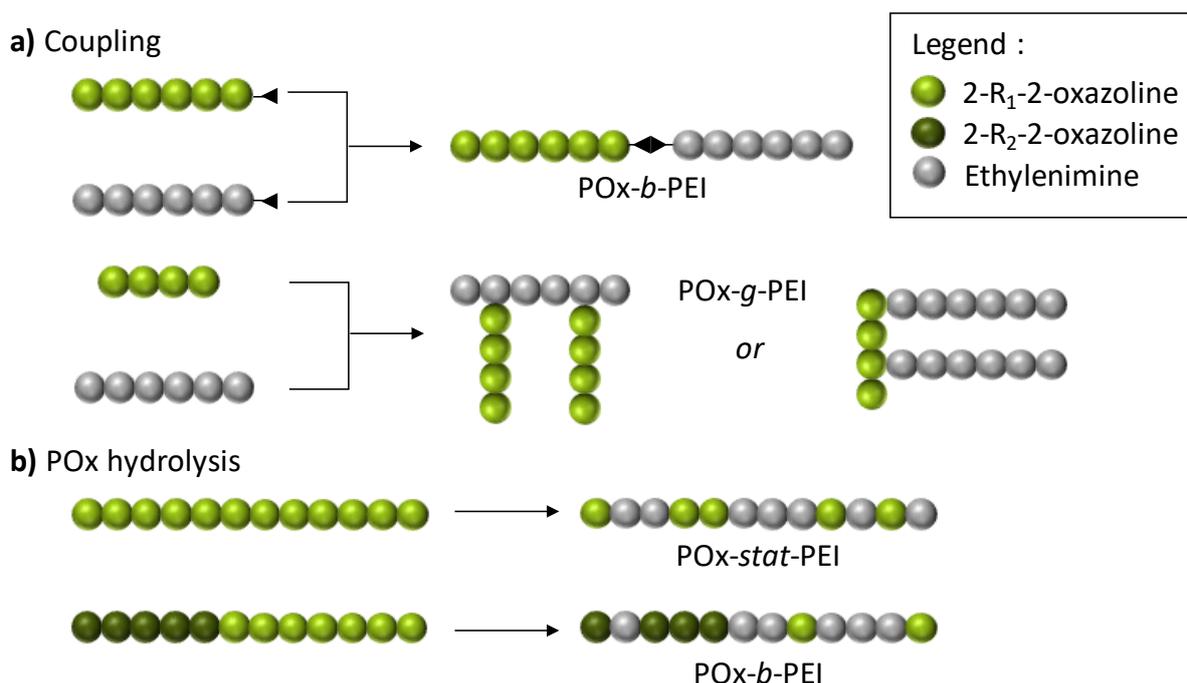


Schéma I.25 : Synthèse de copolymères POx-PEI par (a) couplage covalent d'une chaîne POx et d'une chaîne PEI ou par (b) hydrolyse de POx. (*b* = bloc, *g* = greffé, *stat* = statistique).

II.1. La méthode « coupling »

Cette méthode convergente est un procédé en trois étapes : les synthèses préalables des deux blocs PEI et POx contenant respectivement une fonction réactive, puis le couplage covalent post-polymérisation de ceux-ci. En fonction de la position de la fonction réactive, des copolymères à blocs seront obtenus (fonctions en fin de chaîne) ou des copolymères en peigne dans le cas d'une fonctionnalisation sur le squelette du polymère. Dans de nombreux cas, une PMeOx ou une PEtOx est synthétisée pour le bloc POx puis son hydrolyse permet d'accéder au bloc PEI.

Cette technique est souvent utilisée afin d'obtenir des copolymères à blocs. Cependant, elle présente un inconvénient : le couplage des deux homopolymères nécessite des réactions très efficaces et reste, néanmoins, partiel. L'efficacité du couplage diminue aussi avec l'augmentation des masses molaires des polymères précurseurs, et donc les temps de couplages doivent être très élevés. Des étapes de purification sont nécessaires afin d'éliminer les réactifs de couplage mais également les homopolymères n'ayant pas réagi.

II.2. L'hydrolyse de polyoxazolines

Dans le but de diminuer le nombre d'étapes et de faciliter les purifications, l'hydrolyse de copolymères d'oxazoline est apparue dans la littérature. En effet, la synthèse des PEI linéaires se fait principalement par l'hydrolyse de POx comme indiqué précédemment. Ainsi, une hydrolyse contrôlée des POx permet de synthétiser en deux étapes des copolymères PEI-POx avec des étapes de purifications simples. Kem *et al.*¹³⁹ ont présenté cette voie de synthèse en 1979.

Deux types de structures peuvent être obtenus par cette méthode. Si l'hydrolyse est réalisée sur un homopolymère de façon partielle, alors un copolymère statistique est obtenu. Dans le cas d'un précurseur poly(2-oxazoline) à blocs, une hydrolyse préférentielle ou sélective peut être réalisée ; un copolymère à blocs est alors obtenu.

III. Les copolymères PEI-POx en thérapie génique

III.1. Les copolymères statistiques

Hoogenboom et coll. ont réalisé des études sur l'hydrolyse partielle d'homopolymères POx pour des application biomédicales.^{210,211} Dans le cadre d'une application en thérapie génique, Fernandes *et al.*²¹² ont travaillé en 2013 sur la synthèse de vecteurs à base de PEI partiellement hydrolysées. Des polymères PEtOx-*stat*-PEI sont obtenus avec différents degrés d'hydrolyse et donc différents taux de PEI (30, 70 et 96 %). Lors des tests sur cellules HeLa, les complexes formés avec les PEtOx-PEI30 et 70 affichent une cytotoxicité faible (< 35%) alors que le vecteur le plus hydrolysé se révèle plus toxique avec une viabilité cellulaire de 60,9 % et 44,3 % aux rapports N/P 50 et 100. Cependant, la PEtOx-PEI30 présente la plus faible transfection, la PEtOx-PEI70 à un rapport N/P 100 affiche une efficacité de transfection comparable à celle de la lipofectamine et la PEtOx-PEI96 a démontré la plus forte efficacité. Ainsi, le polymère partiellement hydrolysé PEtOx-PEI70 semble un bon compromis puisqu'il permet une diminution de la cytotoxicité de la PEI tout en conservant une transfection effective.

Néanmoins, une étude de 2018 démontre que l'utilisation de copolymères statistiques PEI-PEtOx n'est pas réellement bénéfique au transfert de gènes. En effet, en comparant une /PEI et une PEI-PEtOx contenant le même nombre de motifs EI, Bauer *et al.*²¹³ montrent que la réduction de densité de charge induite par les motifs EtOx ne semble pas être une bonne solution : d'après leurs résultats, une haute densité de charge permet un transfert de gènes très efficace alors qu'un copolymère PEI-PEtOx induit une diminution de la cytotoxicité relativement modérée.

Ainsi, afin de conserver une haute densité de charge et rendre plus biocompatible ces polymères, la synthèse de copolymères à blocs semble plus judicieuse.

III.2. Les copolymères à blocs double hydrophiles PEI-*b*-POx

Les copolymères à blocs utilisés en biologie sont principalement des polymères amphiphiles, c'est-à-dire avec un bloc hydrophobe pour encapsuler la molécule thérapeutique et un bloc hydrophile pour permettre la solubilisation et la furtivité des complexes formés. La synthèse de copolymères PEI-POx amphiphiles, avec un bloc POx hydrophobe, a été réalisé, par exemple, par Vlassi et Pispas avec un copolymère poly(éthylènimine-*b*-2-phényl-2-oxazoline).²¹⁴

Cependant, en thérapie génique, de tels polymères ne permettent pas une furtivité des nanoparticules. En effet, l'ADN à encapsuler est une molécule hydrophile et chargée négativement. C'est le bloc PEI hydrophile et cationique qui complexe et donc encapsule l'ADN. Puis le bloc POx sert, dans le cadre d'une POxylation, à la furtivité des nanoparticules, il doit donc être également hydrophile. On parle alors de copolymères à blocs double hydrophiles (DHBCs).

En 2006, Juang et son équipe synthétisent une PEtOx terminée par un groupement thioacétate (PEOz-SAc). L'hydrolyse de ce polymère ensuite modifié par du 2,2'-dithiodipyridine conduit à une polyéthylènimine pyridyle disulfide (LPEI-ssPy). Puis, grâce au pont disulfure, le couplage du polymère PEOz-SAc et de la LPEI-ssPy permet de synthétiser un copolymère PEI-*b*-PEtOx (**Schéma I.26**). Néanmoins, les possibilités d'homocouplage au cours de cette réaction (PEOz-*b*-PEOz ou LPEI-LPEI par exemple) ne sont pas discutées dans cette étude. Ce copolymère empêche l'agrégation des polyplexes dans un milieu salin en comparaison à des PEI branchées et linéaires non modifiées. De plus, les cellules exposées à ces vecteurs manifestent une meilleure viabilité cellulaire sans détérioration du transfert de gènes.²¹⁵

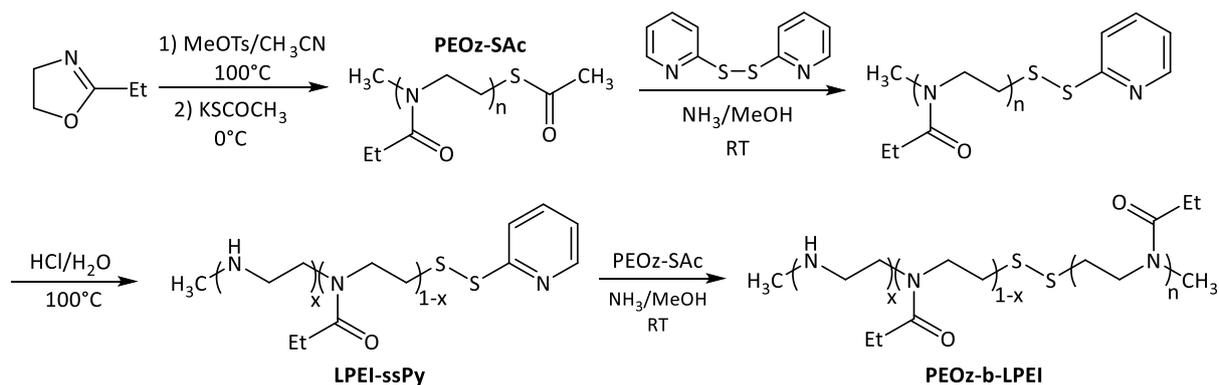


Schéma I.26 : Synthèse du PEOz-*b*-LPEI.²¹⁵

De leur côté, Haladjova *et al.*²¹⁶, en 2018, proposent des polymères *l*PEI-*comb*-PEtOx de différentes masses molaires et taux de greffage. Ils obtiendront de faibles cytotoxicités sur différentes cellules après exposition aux polymères ou aux polyplexes. Cependant, ils affichent une transfection bien plus faible que celle de la *b*PEI.

Néanmoins, ces méthodes « grafting onto » sont fastidieuses avec de nombreuses purifications. Une synthèse de ces DHBCs par hydrolyse sélective semble plus aisée en ce qui concerne le process. Cependant, dans la littérature, peu de publications rapportent de tels travaux. Différentes publications mentionnent des hydrolyses sélectives de copolymères oxazolines mais elles mènent à des polymères amphiphiles et non pas à des doubles hydrophiles.^{217,218}

Hoogenboom et son équipe ont essayé, en 2012, de synthétiser un copolymère à blocs doublement hydrophile PEI-*b*-POx. Une sélectivité partielle sur des copolymères PEtOx₅₀-*b*-PMeOx₅₀ a été obtenue dans un milieu acide eau/ethanol 20/80 v/v (**Schéma I.27**). A bas taux d'hydrolyse de la PMeOx (30%), ils réussissent à hydrolyser environ 13 fois plus de motifs MeOx que de motifs EtOx. Cependant, lorsque le taux d'hydrolyse augmente, la sélectivité décroît fortement : seulement 2 motifs MeOx sont hydrolysés pour 1 motif EtOx lorsque le taux d'hydrolyse en MeOx est de 70%.²¹⁹

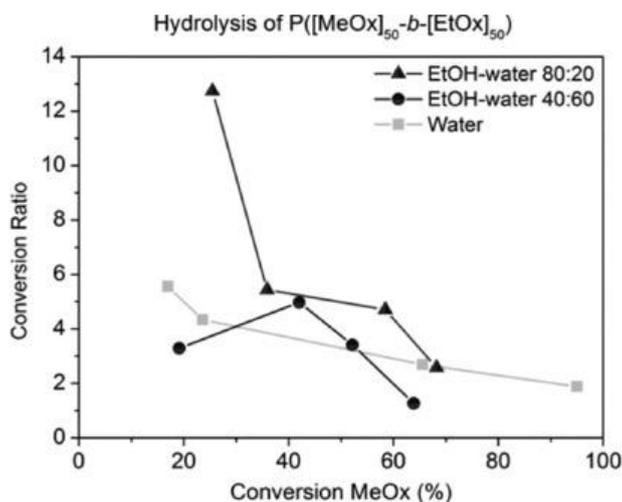


Schéma I.27 : Sélectivité de l'hydrolyse du copolymère PEtOx-*b*-PMeOx en fonction du taux d'hydrolyse de MeOx. Extraite de²¹⁹

La synthèse de DHBCs par hydrolyse sélective de copolymères POx constitue donc un défi de taille. Elle permettrait une nouvelle voie de synthèse simple à mettre en œuvre avec des polymères aisément fonctionnalisables, critères importants si l'on souhaite aller plus loin et penser par exemple à une industrialisation future de ces vecteurs.

Partie IV. La physicochimie des complexes ADN-Polymère

Afin d'évaluer l'efficacité des polymères pour le transfert de gènes, la formulation des complexes est une étape importante. Les paramètres physico-chimiques des nanoparticules vont influencer sur les réponses cellulaires au traitement *in vitro* et/ou *in vivo*. Il est donc important, d'une part, de comprendre les différentes lois entrant en jeu lors de la formation des polyplexes ainsi que de connaître, d'autre part, les prérequis nécessaires pour les utiliser lors d'expériences biologiques.

I. La formation du complexe

I.1. Les polyélectrolytes

D'après la définition IUPAC, les polyélectrolytes sont des polymères composés de macromolécules dans lesquelles une partie substantielle des unités constitutionnelles contient des groupes ioniques ou ionisables.²²⁰ En solution, ces polymères sont alors chargés positivement, polycations, ou négativement, polyanions, et sont classés en deux catégories : faibles ou forts. Dans le cadre de la thérapie génique non-virale à base de PEI, les complexes sont constitués d'un polyanion fort, l'ADN, et d'un polycation faible, la PEI.

I.1.a. L'ADN, polyanion fort

Dans le cas d'un polyélectrolyte dit « fort », les groupes ionisables sont alors complètement dissociés en solution aqueuse indépendamment du pH. C'est le cas de l'ADN et de ses groupes phosphates. Ainsi, l'ADN double brin porte 2 charges e^- par paire de base (Schéma I.28).

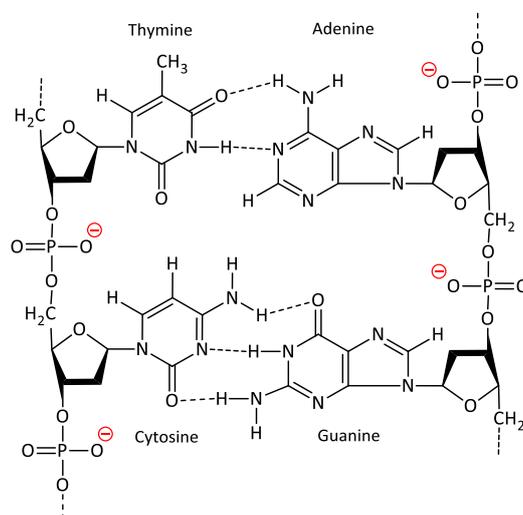


Schéma I.28 : Structure de l'ADN double brin chargé négativement.

Cependant afin de respecter l'électroneutralité de la solution, les contre-ions présents en solution écrantent ces charges. La condensation de ces contre-ions, également nommée la condensation de Manning, permet ainsi de réduire la charge effective du polyélectrolyte en dessous d'une valeur critique.²²¹ Si la distance entre deux charges le long de la chaîne polymère est inférieure à la longueur de Bjerrum (**Equation I.1**), les interactions de Coulomb dominent et la condensation d'un contre-ion est alors favorisée.

$$\text{Équation I.1} \quad \lambda_B = \frac{e_0^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r k_B T}$$

Avec e_0 la charge élémentaire ($1,602 \cdot 10^{-19}$ C), ϵ_0 la permittivité du vide ($8,8542 \cdot 10^{-12}$ F.m⁻¹), ϵ_r la constante diélectrique du milieu, k_B la constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J.K⁻¹) et T la température en Kelvin.

Dans l'eau, la longueur de Bjerrum étant d'environ 7 Å, ce phénomène est pertinent dans le cas de l'ADN puisque deux bases, donc deux charges, sont distantes de 3,4 Å. Il y a donc condensation de contre-ions tout le long de ce polyélectrolyte.

I.1.b. La polyéthylènimine, polycation faible

La PEI est, quant à elle, partiellement chargée en solution. Ses groupes ionisables, des amines secondaires, sont des bases faibles ; le polymère est donc un polyélectrolyte faible. Sa densité de charge varie avec le pH et est liée à la constante d'équilibre K_b selon l'**Équation I.2**.



Il est à noter que la constante ionique apparente K_b augmente avec le taux d'ionisation puisque la protonation d'un nouvel azote à proximité d'un azote déjà chargé est difficile. Ainsi, il est nécessaire de diminuer plus fortement le pH pour permettre cette nouvelle protonation. L'**Équation I.3** relie le pK_b et le pH en fonction du degré d'ionisation α du polyélectrolyte :

$$\text{Équation I.3} \quad pK_b = pK_e - pH + \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right)$$

Avec pK_e logarithme négatif du produit ionique de l'eau ($pK_e = 14$)

La **Figure I.4** représente l'évolution de ces paramètres dans le cas d'une solution aqueuse de PEI à 1% massique.

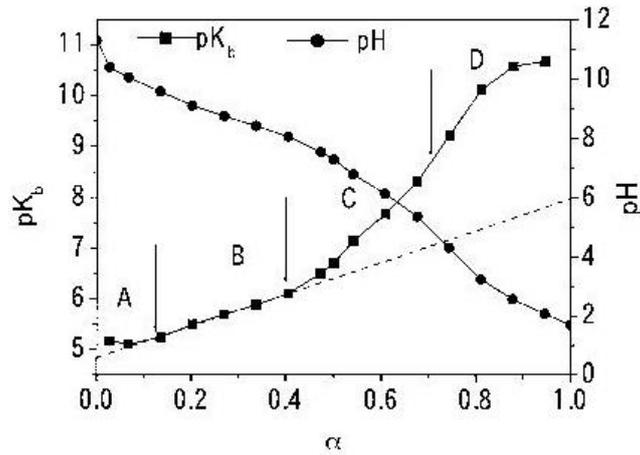


Figure I.4 : Constante ionique apparente pK_b et pH en fonction du degré d'ionisation pour une solution aqueuse de PEI à 1 % massique. Extrait de²²²

De plus, le taux d'ionisation influera sur la solubilité et sur la conformation du polyélectrolyte en solution. En milieu dilué, les polymères non chargés adoptent une conformation en pelote statistique. Dans le cas de polyélectrolytes, les charges le long de la chaîne polymère entraînent des répulsions intra et inter moléculaires. Plus le polymère est chargé, plus une conformation étirée est adoptée. L'écrantage des charges qui diminue alors la répulsion mènera vers des conformations moins étirées (**Schéma I.29**). Le polyélectrolyte s'approche d'une conformation d'un polymère neutre lorsque cet écrantage est fort.

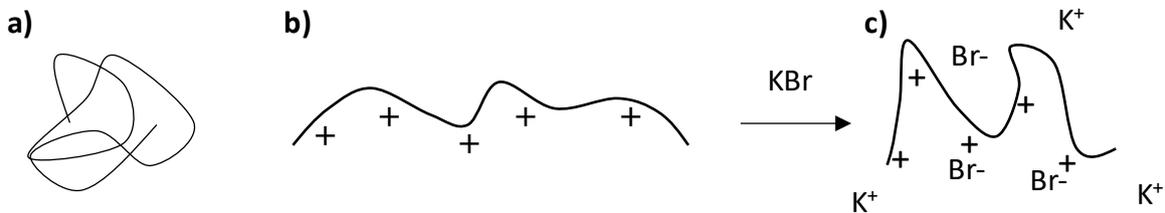


Schéma I.29 : Conformation (a) en pelote statistique, (b) étirée d'un polyélectrolyte, (c) avec influence de l'écrantage des charges. Adapté de²²³

I.2. La complexation

Lors de la mise en contact des solutions de polymère et d'ADN, les charges de ces deux éléments vont permettre la formation d'un complexe. En effet, le polymère étant un polycation et l'ADN un polyanion, les interactions électrostatiques et l'entropie vont guider la formation d'un polyplexe. Bungerberg de Fong²²⁴ et Fuoss et Sadek²²⁵ reportent, en 1949, les premières études sur ce type d'interactions. La complexation de deux polyions en solution est favorisée par un gain entropique. Une solution contenant un seul polyélectrolyte présente une concentration en contre-ions plus élevée au voisinage de celui-ci par l'écrantage des charges.

Cette répartition non uniforme engendre une perte d'entropie qui peut être rétablie lors de la complexation d'un polycation et d'un polyanion. Celle-ci permettant le relargage des contre-ions, une distribution uniforme pourra être obtenue. La complexation est alors favorable.

La formation de complexes de polyélectrolytes se déroule en plusieurs temps. Bakeev *et al.*²²⁶ définissent 3 étapes (**Schéma I.30**):

- (i) La nucléation par l'appariement des ions de charges opposées forme des complexes primaires ;
- (ii) La croissance avec la formation de réseaux hors équilibre mène à des complexes secondaires ordonnés ;
- (iii) Enfin, le réarrangement via la lente relaxation des chaînes polymère crée des agrégats complexes.

La première étape est instantanée lorsque les deux polyélectrolytes sont mis en contact alors que les étapes suivantes sont plus longues. Nous rappelons ici que dans le cas de l'ADN et d'un polyélectrolyte positif, ces agrégats peuvent se réarranger, donnant lieu à des redistributions pouvant affecter la composition et la taille des objets formés.¹⁷⁸

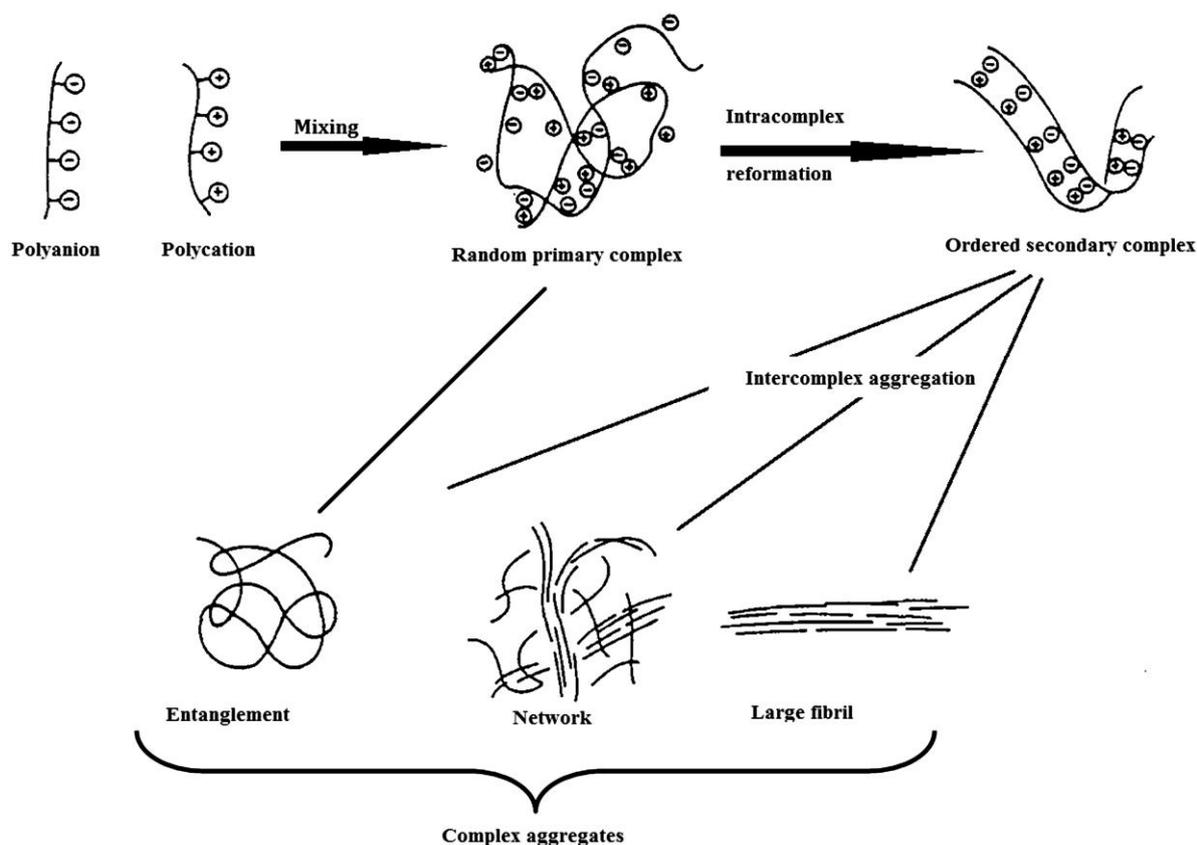


Schéma I.30 : Représentation schématique de l'agrégation de polyélectrolytes en 3 étapes. Extrait de^{227,228}

Différentes recherches ont montré que la complexation est influencée par la nature des contre-ions, la concentration des polyélectrolytes, des charges, des sels, la température ou encore la conformation des chaînes (**Schéma I.31**).²²⁷

Factors affecting formation and stability of PECs		
Structure Parameters	Media Parameters	Preparation Parameters
<ul style="list-style-type: none"> • Charge-to-charge stoichiometry • Charge density • Molecular weight of polyelectrolytes 	<ul style="list-style-type: none"> • Polyelectrolyte concentration • pH of reaction medium • Ionic strength of reaction medium • Salt concentration 	<ul style="list-style-type: none"> • Mode of mixing of polyelectrolytes • Order of mixing of polyelectrolytes • Mixing ratio • Duration of interaction

Schéma I.31 : Les différents facteurs influençant la formation de complexes de polyélectrolytes. Adapté de²²⁷

Par exemple, dans le cas de la condensation de l'ADN par un polycation, Baldwin et Widom démontrent que la cinétique de complexation est plus lente lorsque la concentration en ADN augmente.²²⁹ A basse concentration (0,32 μM), la condensation peut s'effectuer en quelques minutes (2 min), alors qu'environ une heure est nécessaire à plus haute concentration (1,58 μM).

I.3. Méthode de formulation

La formulation de complexes ADN/PEI se fait, classiquement, par ajout d'une solution de l'un des polyélectrolytes dans l'autre solution, sous agitation. Comme indiqué précédemment, le ratio entre les deux polyélectrolytes, ainsi que l'ordre d'ajout, peut avoir une influence sur la complexation et donc sur la taille des complexes.

Dans l'optique de connaître l'influence du ratio entre les polyélectrolytes, Mengarelli *et al.*²³⁰ ont analysé la taille de polyplexes ADN/lPEI en milieu dilué et à l'équilibre par DLS en ajoutant progressivement une solution de lPEI à une solution d'ADN, faisant ainsi varier le rapport N^+/P^- (ratio noté x). Il est important de noter que celui-ci est différent du rapport N/P, plus généralement utilisé, qui ne tient pas compte de la protonation partielle des amines de la PEI. La **Figure I.5 (a et b)** souligne ainsi différents comportements en fonction de x :

- $x < 0,8$, soit un excès de charges négatives : des complexes avec un rayon hydrodynamique R_h inférieur à 100 nm sont obtenus avec une mobilité électrophorétique négative correspondant à la charge de surface.
- $0,8 < x < 1$: une forte augmentation de la taille des complexes est observée jusqu'à l'obtention de particules de plusieurs micromètres. Cette agrégation a lieu dans une zone proche de la neutralité.
- $x > 1,1$: l'ajout de PEI conduit à un excès de charges positives qui permet de diminuer la taille des polyplexes. Des nanoparticules avec un R_h autour de 100 nm sont, de nouveau, obtenues avec une charge de surface positive.

Ces observations confirment les conclusions de Sato et coll.²³¹ sur la répulsion électrostatique permise par un mélange non équimolaire des polyélectrolytes (**Figure I.5.c**). Ils exposent que, lors d'un mélange non équimolaire, les chaînes en excès peuvent venir s'adsorber en surface. Ces ions en excès permettent une répulsion des complexes entre eux permettant leur stabilisation.

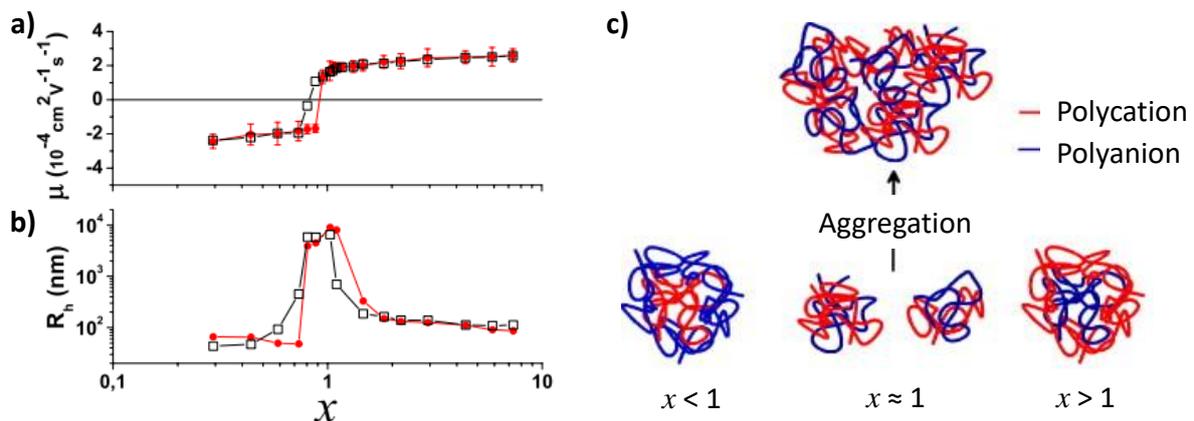


Figure I.5 : (a) Mobilité électrophorétique et (b) rayon hydrodynamique en fonction du rapport de charges x (concentration en ADN $c = 0,01\%$ (w/v), force ionique $[I] = 0,15 \text{ M}$ et $\text{pH} = 7,4$. Complexes ADN/PEI 2,5 kDa (\square) et ADN/PEI 25 kDa (\bullet) ; Extrait de²³⁰). (c) Représentation schématique des structures obtenues en fonction du rapport x . Adapté de²³²

Les formulations pour la thérapie génique étant réalisées avec un excès de PEI, l'ajout de la solution d'ADN, en défaut, sur la solution de PEI semble donc plus justifié afin de contourner ce diagramme de phase (soit de la droite vers la gauche sur la **Figure I.5.b**).

Néanmoins, en 2004, une étude de Schatz *et al.*²³³ examine l'influence de l'ordre d'addition des polyélectrolytes (celui en défaut sur celui en excès ou celui en excès sur celui en défaut) sur la taille et la stabilité des complexes. Ils étudient alors deux types de mélange ; un goutte-à-goutte lent ou un mélange rapide ; avec des solutions de sulfate de dextrane

(polyanion) et de chitosane. (polycation). Les résultats soulignent que, lors du mélange rapide des solutions, l'ordre l'addition des polyélectrolytes n'a pas d'influence sur la taille et la stabilité des complexes. Dans le cas de formulations par goutte-à-goutte lent, l'ajout de celui en défaut sur celui en excès est préconisé par les auteurs afin d'éviter une agrégation. Cependant, Boussif *et al.*⁴⁹ avaient souligné, en 1995, que les complexes ADN/*b*PfEI réalisés par un ajout goutte-à-goutte de l'ADN en défaut sur la *b*PfEI en excès était 10 fois moins efficace en transfection sur des cellules 3T3 que l'inverse.

Ainsi, aujourd'hui, les formulations standard se font principalement par l'ajout de la solution de polymère (en excès) dans la solution d'ADN (en défaut) sous agitation et d'une durée de quelques secondes. Cette formulation, contre-intuitive au vu du diagramme de phase, nécessite de traverser une zone de précipitation du complexe ($x=1$, **Figure I.5**) et provoque une agrégation des macromolécules, qu'il est difficile de maîtriser dans le cas de solutions concentrées.

De plus, il est intéressant de noter que l'excès de chaînes polymère et donc de charges positives est important pour la stabilité des complexes formés mais également pour garantir une bonne transfection. En effet, cet excès n'est pas en totalité complexé en surface des complexes, une partie des chaînes cationiques restant libre en solution. Bien que la toxicité peut être liée à ces chaînes libres, une bonne transfection nécessite leur présence comme l'ont montré diverses recherches.²³⁴ Ces polymères libres pourront, néanmoins, être éliminés par la filtration rénale s'ils ont une masse molaire inférieure à 30 kDa et qu'ils n'ont pas interagi avec des protéines du sang chargées négativement à pH physiologique (albumine de sérum bovin ou immunoglobuline par exemple) créant alors une augmentation de leur taille.

II. Les contraintes des tests biologiques

Afin d'évaluer l'efficacité des complexes, des tests *in vitro* et *in vivo* sont mis en place. Cependant, les formulations doivent respecter un cahier des charges spécifique permettant de réaliser chaque type de test.

II.1. *In vitro*

Lors des tests *in vitro*, la transfection des cellules est testée avec des complexes de faible concentration. En effet, les formulations sont réalisées à partir d'une solution d'ADN (plasmidique par exemple) à 1 mg.mL⁻¹ et le volume approprié d'une solution de polymère à 0,5 mg.mL⁻¹ est ajouté afin d'obtenir des complexes au ratio N/P souhaité. Le solvant utilisé est

généralement un tampon Hepes 10 mM. Ces complexes sont, ensuite, ajoutés sur les cellules avec du milieu de culture, la concentration finale en ADN étant entre 1 et 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Un nombre important de travaux reporte la formation de complexes stables avec des diamètres moyens inférieurs à 100 nm, ce qui est requis pour les études ultérieures *in vivo*.^{164,235,236}

II.2. *In vivo*

Après des premiers tests concluants *in vitro*, les expériences *in vivo* peuvent être menées. Cependant, comme dit précédemment, la thérapie génique non-virale montre une efficacité moindre en comparaison des vecteurs viraux.

Cette différence d'efficacité peut s'expliquer par la quantité d'ADN véhiculé. En effet, pour un patient, une thérapie génique virale véhicule $6,24.10^{14}$ particules/kg, soit autant de copie d'ADN puisque chaque capsid virale comporte une copie du gène.²³⁷ Cela correspond par exemple à 131 μg d'ADN/kg pour le plasmide PTG11033 de 9,6 kpb.

En effet, $6,24.10^{14}$ copies. kg^{-1} correspond à $1,04.10^{-9}$ mol. kg^{-1} d'ADN en divisant par le nombre d'Avogadro. Les plasmides PTG11033 ayant une masse molaire de $6,34.10^6$ g. mol^{-1} (9,6 kpb et 660 g. mol^{-1} par paire de base), il faut donc véhiculer $6,56.10^{-3}$ g. kg^{-1} d'ADN. Dans le cas d'une souris d'en moyenne 20 g, cela représente alors 131 μg .

Une souris ayant un volume sanguin d'environ 1,8 mL, le volume injecté ne peut pas dépasser 200 μL pour maintenir l'homéostasie du corps. Ainsi, la formulation doit être effectuée à une concentration minimale de $655 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, soit très supérieure à celle utilisée *in vitro*. Cette contrainte est nécessaire afin de pouvoir s'approcher des résultats obtenus en thérapie non-virale.

Cependant, cette concentration élevée peut entraîner une augmentation de la taille des polyplexes, voire une agrégation. Cette augmentation s'explique notamment par la concentration C^* qui est la concentration de recouvrement d'un polymère. C^* est définie par l'Équation I.4. Au-dessous de celle-ci, on parle de solution diluée avec des chaînes éloignées les unes des autres. Pour une concentration proche de C^* , une solution semi-diluée est obtenue dans laquelle les chaînes polymère se touchent, puis les chaînes s'interpénètrent conduisant à un pseudo-réseau lorsque la concentration est supérieure à C^* .

Équation I.4
$$C^* \approx \frac{4}{3} \frac{\pi M}{N_A R_G^3}$$

Avec M la masse molaire du polymère, N_A le nombre d'Avogadro et R_G le rayon de giration du polymère.

Les valeurs de C^* ont été calculées pour 3 fragments d'ADN linéarisés grâce aux rayons de girations estimés par Smith *et al.*²³⁸ (**Tableau I.6**). Pour le *pTG11033* de 9,6 kDa, la C^* déterminée est de l'ordre de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$. Nous nous plaçons, ainsi, à une valeur proche de la concentration de recouvrement si l'on souhaite formuler des solutions à une concentration de l'ordre de 1 mg.mL^{-1} en ADN. Cette situation contribue aux phénomènes d'agrégation observés lors de la formulation de polyplexes, et constitue un verrou limitant les développements dans le domaine du transfert de gènes par des vecteurs synthétiques polymères.

Tableau I.6 : Calcul des C^* en fonction des R_G estimés par Smith *et al.*²³⁸ pour trois plasmides linéarisés de taille variable.

Size (bp)	Molas masse (g.mol^{-1})	R_G (μm)	C^* (g.L^{-1})
4361	2 878 000	0.18	3.43
6557	4 328 000	0.24	2.17
9416	6 215 000	0.31	1.45

De plus, lors d'essais *in vivo*, notamment par injection systémique, la solution injectée doit contenir des solutés indispensables au respect de l'homéostasie cellulaire. Ainsi, les formulations doivent être préparées dans une solution de glucose 5% ou de NaCl 150 mM.

Il est donc nécessaire de revisiter les conditions de formulations permettant d'obtenir des complexes de ces polyélectrolytes à une concentration en ADN élevée dans le solvant adéquat tout en conservant une stabilité et une taille inférieure à 100 nm. L'étude des paramètres physico-chimiques systématiques des formulations est importante.

Conclusion

Pour conclure cette étude bibliographique sur la thérapie génique, de ses prémices aux résultats les plus récents, le **Schéma I.32** reprend les différents paramètres dont nous avons discuté et qui influent sur l'efficacité de la transfection médiée par un complexe ADN/polymère. Afin d'obtenir des complexes très performants, l'ensemble de ces paramètres doivent être pris en compte. L'élaboration de ces polyplexes compétitifs demande donc de nombreux ajustements.

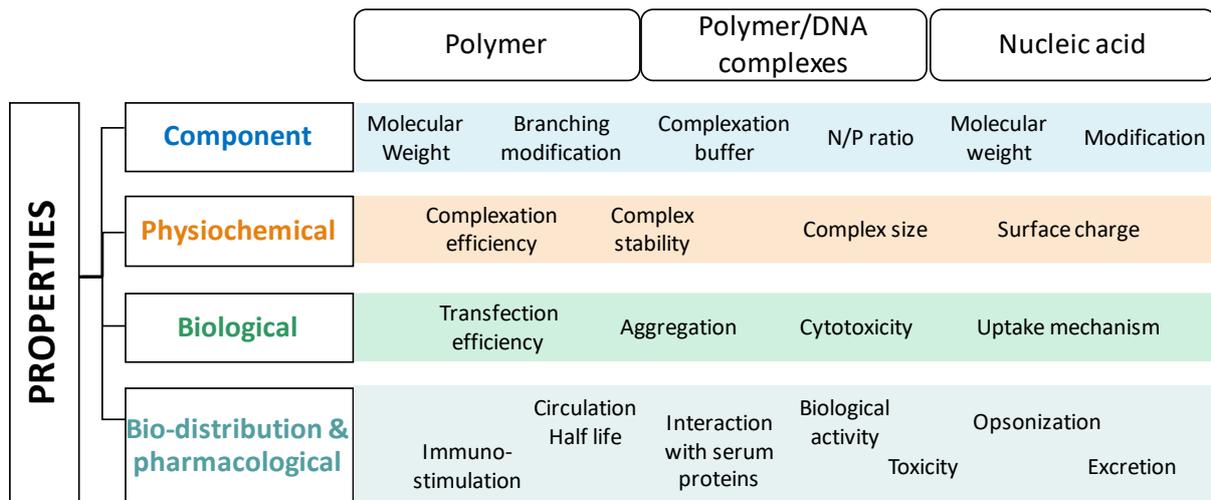


Schéma I.32 : Facteurs affectant les performances des polyplexes. Adapté de²³⁹

L'objectif de la thèse

Les polyplexes sont, aujourd'hui, largement étudiés dans le but de remplacer les vecteurs viraux dans le domaine de la thérapie génique. Les polymères les plus prometteurs sont les polyéthylènimines qui, par leur caractère cationique, complexent efficacement l'ADN. D'autre part, les recherches ont montré qu'une PEGylation permettait une furtivité de ces vecteurs. Néanmoins, la réaction du système immunitaire envers ces nanoparticules PEGylées mène les recherches vers des alternatives par exemple en utilisant les poly(oxazoline)s. Ces polymères à la synthèse contrôlée et aux propriétés ajustables sont les principaux précurseurs des PEI. C'est pourquoi la synthèse de copolymères doubles hydrophiles PEI-POx représentent une alternative d'intérêt aux PEI-PEG. Cependant, aujourd'hui, la synthèse de ces copolymères par hydrolyse reste un défi dû à un manque de sélectivité de la réaction.

Ainsi, dans ce travail de thèse, nous nous proposons de mettre au point une stratégie de synthèse permettant d'obtenir une bibliothèque de DHBCs POx-PEI en peu d'étapes. La fonctionnalisation de ces copolymères sera ensuite étudiée afin d'améliorer le transfert de gènes : d'une part, nous nous intéresserons au greffage de ligands de reconnaissance cellulaire afin d'accentuer le ciblage cellulaire ; et d'autre part, des résidus histidine permettant une amélioration de l'effet tampon nécessaire à la délivrance des vecteurs dans le cytosol seront couplés aux chaînes PEI.

La formulation des polyplexes sera réalisée avec pour objectif l'obtention de nanoparticules polyvalentes de taille inférieure à 100 nm et ayant une concentration élevée en ADN. Pour cela, la synthèse de nanoparticules contenant un unique plasmide est souhaitée. Leur taille, morphologie et stabilité seront analysées avant de les utiliser dans le cadre d'études *in vitro* et *in vivo*. Nous déterminerons ainsi les paramètres de synthèse macromoléculaire et de formulation garantissant le meilleur transfert de gènes.

Références

- (1) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- (2) Médicaments de thérapie génique - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé <https://ansm.sante.fr/Produits-de-sante/Medicaments-de-therapie-genique> (accessed Mar 26, 2020).
- (3) EUR-Lex - 02001L0083-20121116 - EN - EUR-Lex <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02001L0083-20121116> (accessed Apr 1, 2020).
- (4) Song, E.; Lee, S.-K.; Wang, J.; Ince, N.; Ouyang, N.; Min, J.; Chen, J.; Shankar, P.; Lieberman, J. RNA Interference Targeting Fas Protects Mice from Fulminant Hepatitis. *Nat. Med.* **2003**, *9* (3), 347–351. <https://doi.org/10.1038/nm828>.
- (5) Mantus, D.; Pisano, D. J. *FDA Regulatory Affairs: Third Edition*; CRC Press, 2014.
- (6) Griffith, Fred. The Significance of Pneumococcal Types. *J hyg (lond)* **1928**, *27* (2), 113–159. <https://doi.org/10.1017/s0022172400031879>.
- (7) Avery, O. T.; MacLeod, C. M.; McCarty, M. Studies On The Chemical Nature Of The Substance Inducing Transformation Of Pneumococcal Types. *J Exp Med* **1944**, *79* (2), 137–158. <https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>.
- (8) Zinder, N. D.; Lederberg, J. Genetic Exchange In Salmonella. *J Bacteriol* **1952**, *64* (5), 679–699.
- (9) Szybalska, E. H.; Szybalski, W. Genetics of Human Cell Lines, Iv. Dna-Mediated Heritable Transformation of a Biochemical Trait. *PNAS* **1962**, *48* (12), 2026–2034. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.12.2026>.
- (10) Tatum, E. L. Molecular Biology, Nucleic Acids, and the Future of Medicine. *Perspect Biol Med* **1966**, *10* (1), 19–32. <https://doi.org/10.1353/pbm.1966.0027>.
- (11) Rogers, S.; Lowenthal, A.; Terheggen, H. G.; Columbo, J. P. Induction of Arginase Activity with the Shope Papilloma Virus in Tissue Culture Cells from an Argininemic Patient. *J. Exp. Med.* **1973**, *137* (4), 1091–1096. <https://doi.org/10.1084/jem.137.4.1091>.
- (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.* **1990**, *323* (9), 570–578. <https://doi.org/10.1056/NEJM199008303230904>.
- (13) Blaese, R. M.; Culver, K. W.; Miller, A. D.; Carter, C. S.; Fleisher, T.; Clerici, M.; Shearer, G.; Chang, L.; Chiang, Y.; Tolstoshev, P.; Greenblatt, J. J.; Rosenberg, S. A.; Klein, H.; Berger, M.; Mullen, C. A.; Ramsey, W. J.; Muul, L.; Morgan, R. A.; Anderson, W. F. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results after 4 Years. *Science* **1995**, *270* (5235), 475–480. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475>.
- (14) Puumalainen, A. M.; Vapalahti, M.; Agrawal, R. S.; Kossila, M.; Laukkanen, J.; Lehtolainen, P.; Viita, H.; Paljärvi, L.; Vanninen, R.; Ylä-Herttua, S. Beta-Galactosidase Gene Transfer to Human Malignant Glioma in Vivo Using Replication-Deficient Retroviruses and Adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* **1998**, *9* (12), 1769–1774. <https://doi.org/10.1089/hum.1998.9.12-1769>.
- (15) Stolberg, S. G. The Biotech Death of Jesse Gelsinger. *N Y Times Mag* **1999**, 136–140, 149–150.
- (16) Gene Therapy Clinical Trials Worldwide <http://www.abedia.com/wiley/index.html> (accessed Mar 26, 2020).

- (17) Etude 2019 sur les Médicaments de thérapie innovante (MTI) <https://biotechinfo.fr/article/etude-2019-sur-les-medicaments-de-therapie-innovante-mti/> (accessed Apr 3, 2020).
- (18) Wilson, J. M. Gendicine: The First Commercial Gene Therapy Product; Chinese Translation of Editorial. *Hum Gene Ther* **2005**, *16* (9), 1014–1015. <https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.1014>.
- (19) Ylä-Herttuala, S. Endgame: Glybera Finally Recommended for Approval as the First Gene Therapy Drug in the European Union. *Mol. Ther* **2012**, *20* (10), 1831–1832. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.194>.
- (20) FDA Approves First Oncolytic Virus Therapy: Imlygic for Melanoma. *Oncology Times* **2015**, *37* (23), 36. <https://doi.org/10.1097/01.COT.0000475724.97729.9e>.
- (21) Akinc, A.; Maier, M. A.; Manoharan, M.; Fitzgerald, K.; Jayaraman, M.; Barros, S.; Ansell, S.; Du, X.; Hope, M. J.; Madden, T. D.; Mui, B. L.; Semple, S. C.; Tam, Y. K.; Ciufolini, M.; Witzigmann, D.; Kulkarni, J. A.; van der Meel, R.; Cullis, P. R. The Onpattro Story and the Clinical Translation of Nanomedicines Containing Nucleic Acid-Based Drugs. *Nanotechnol* **2019**, *14* (12), 1084–1087. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0591-y>.
- (22) WIREs, auteurs de. A new, inhaled siRNA therapeutic option for asthma. *Advanced Science News*, 2020.
- (23) Gene Therapy Products on the Market <http://www.genetherapynet.com/gene-therapy-products-on-the-market.html> (accessed Apr 6, 2020).
- (24) AL Qtaish, N.; Gallego, I.; Villate-Beitia, I.; Sainz-Ramos, M.; López-Méndez, T. B.; Grijalvo, S.; Eritja, R.; Soto-Sánchez, C.; Martínez-Navarrete, G.; Fernández, E.; Puras, G.; Pedraz, J. L. Niosome-Based Approach for In Situ Gene Delivery to Retina and Brain Cortex as Immune-Privileged Tissues. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (3), 198. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030198>.
- (25) Wang, D.; Gao, G. State-Of-The-Art Human Gene Therapy: Part II. Gene Therapy Strategies and Clinical Applications. *Discov Med* **2014**, *18* (98), 151–161.
- (26) What is gene therapy? /facts/what-is-gene-therapy (accessed Apr 2, 2020).
- (27) Nayerossadat, N.; Maedeh, T.; Ali, P. A. Viral and Nonviral Delivery Systems for Gene Delivery. *Adv Biomed Res* **2012**, *1*. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.98152>.
- (28) Mockey, M.; Bourseau, E.; Chandrashekhara, V.; Chaudhuri, A.; Lafosse, S.; Cam, E. L.; Quesniaux, V. F. J.; Ryffel, B.; Pichon, C.; Midoux, P. mRNA-Based Cancer Vaccine: Prevention of B16 Melanoma Progression and Metastasis by Systemic Injection of MART1 mRNA Histidylated Lipopolyplexes. *Cancer Gene Ther* **2007**, *14* (9), 802–814. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7701072>.
- (29) Rasolonjatovo, B.; Illy, N.; Bennevault, V.; Mathé, J.; Midoux, P.; Le Gall, T.; Haudebourg, T.; Montier, T.; Lehn, P.; Pitard, B.; Cheradame, H.; Huin, C.; Guégan, P. Temperature-Sensitive Amphiphilic Non-Ionic Triblock Copolymers for Enhanced In Vivo Skeletal Muscle Transfection. *Macromol Biosci* **2020**, *20* (3), 1900276. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900276>.
- (30) Guillaume, C.; Delépine, P.; Droal, C.; Montier, T.; Tymen, G.; Claude, F. Aerosolization of Cationic Lipid-DNA Complexes: Lipoplex Characterization and Optimization of Aerosol Delivery Conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *286* (3), 464–471. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5418>.
- (31) Shim, G.; Kim, D.; Park, G.; Jin, H.; Suh, S.-K.; Oh, Y.-K. Therapeutic Gene Editing: Delivery and Regulatory Perspectives. *Acta Pharm Sinic* **2017**, *38*. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.2>.

- (32) Latulippe, D. R.; Zydney, A. L. Radius of Gyration of Plasmid DNA Isoforms from Static Light Scattering. *Biotechnol Bioeng* **2010**, *107* (1), 134–142. <https://doi.org/10.1002/bit.22787>.
- (33) Pichon, C.; Billiet, L.; Midoux, P. Chemical Vectors for Gene Delivery: Uptake and Intracellular Trafficking. *Curr Opin Biotech* **2010**, *21* (5), 640–645. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.07.003>.
- (34) Yang, W.; Peters, J. I.; Williams, R. O. Inhaled Nanoparticles—A Current Review. *Int J Pharm* **2008**, *356* (1), 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.02.011>.
- (35) Resnier, P.; Mottais, A.; Sibiril, Y.; Le Gall, T.; Montier, T. Challenges and Successes Using Nanomedicines for Aerosol Delivery to the Airways. *Curr Gene Ther* **2016**, *16* (1), 34–46. <https://doi.org/10.2174/1566523216666160104142013>.
- (36) Bertrand, N.; Leroux, J.-C. The Journey of a Drug-Carrier in the Body: An Anatomico-Physiological Perspective. *J Control Release* **2012**, *161* (2), 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.098>.
- (37) Owens, D. E.; Peppas, N. A. Opsonization, Biodistribution, and Pharmacokinetics of Polymeric Nanoparticles. *Int J Pharm* **2006**, *307* (1), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>.
- (38) Plank, C.; Mechtler, K.; Szoka, F. C.; Wagner, E. Activation of the Complement System by Synthetic DNA Complexes: A Potential Barrier for Intravenous Gene Delivery. *Hum Gene Ther* **1996**, *7* (12), 1437–1446. <https://doi.org/10.1089/hum.1996.7.12-1437>.
- (39) Tavares, A. J.; Poon, W.; Zhang, Y.-N.; Dai, Q.; Besla, R.; Ding, D.; Ouyang, B.; Li, A.; Chen, J.; Zheng, G.; Robbins, C.; Chan, W. C. W. Effect of Removing Kupffer Cells on Nanoparticle Tumor Delivery. *PNAS* **2017**, *114* (51), E10871–E10880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713390114>.
- (40) Donahue, N. D.; Acar, H.; Wilhelm, S. Concepts of Nanoparticle Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Kinetics in Nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *143*, 68–96. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008>.
- (41) Sahay, G.; Alakhova, D. Y.; Kabanov, A. V. Endocytosis of Nanomedicines. *J Control Release* **2010**, *145* (3), 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.036>.
- (42) Aderem, A.; Underhill, D. M. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annu Rev Immunol* **1999**, *17* (1), 593–623. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>.
- (43) Rosales, C.; Uribe-Querol, E. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Research International* **2017**, *2017*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>.
- (44) McMahan, H. T.; Boucrot, E. Molecular Mechanism and Physiological Functions of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2011**, *12* (8), 517–533. <https://doi.org/10.1038/nrm3151>.
- (45) Parton, R. G.; Simons, K. The Multiple Faces of Caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8* (3), 185–194. <https://doi.org/10.1038/nrm2122>.
- (46) Kerr, M. C.; Teasdale, R. D. Defining Macropinocytosis. *Traffic* **2009**, *10* (4), 364–371. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00878.x>.
- (47) Billiet, L.; Gomez, J.-P.; Berchel, M.; Jaffrès, P.-A.; Le Gall, T.; Montier, T.; Bertrand, E.; Cheradame, H.; Guégan, P.; Mével, M.; Pitard, B.; Benvegna, T.; Lehn, P.; Pichon, C.; Midoux, P. Gene Transfer by Chemical Vectors, and Endocytosis Routes of Polyplexes, Lipoplexes and Lipopolyplexes in a Myoblast Cell Line. *Biomaterials* **2012**, *33* (10), 2980–2990. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.027>.
- (48) Nelson, N. Structure and Pharmacology of the Proton-ATPases. *Trends Pharmacol Sci* **1991**, *12*, 71–75. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90501-I](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90501-I).
- (49) 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.* **1995**, 92 (16), 7297–7301. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>.
- (50) Vale, R. D. Intracellular Transport Using Microtubule-Based Motors. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1987**, 3 (1), 347–378. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.03.110187.002023>.
- (51) Mermall, V.; Post, P. L.; Mooseker, M. S. Unconventional Myosins in Cell Movement, Membrane Traffic, and Signal Transduction. *Science* **1998**, 279 (5350), 527–533. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.527>.
- (52) Grosse, S.; Aron, Y.; Thévenot, G.; Monsigny, M.; Fajac, I. Cytoskeletal Involvement in the Cellular Trafficking of Plasmid/PEI Derivative Complexes. *J Control Release* **2007**, 122 (1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.06.015>.
- (53) Breuzard, G.; Tertilt, M.; Gonçalves, C.; Cheradame, H.; Géguan, P.; Pichon, C.; Midoux, P. Nuclear Delivery of NFκB-Assisted DNA/Polymer Complexes: Plasmid DNA Quantitation by Confocal Laser Scanning Microscopy and Evidence of Nuclear Polyplexes by FRET Imaging. *Nucleic Acids Res* **2008**, 36 (12), e71–e71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn287>.
- (54) Zauner, W.; Brunner, S.; Buschle, M.; Ogris, M.; Wagner, E. Differential Behaviour of Lipid Based and Polycation Based Gene Transfer Systems in Transfecting Primary Human Fibroblasts: A Potential Role of Polylysine in Nuclear Transport. *BBA-Gen Subjects* **1999**, 1428 (1), 57–67. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00022-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00022-7).
- (55) Mehier-Humbert, S.; Guy, R. H. Physical Methods for Gene Transfer: Improving the Kinetics of Gene Delivery into Cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57 (5), 733–753. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.12.007>.
- (56) Heller, L. C.; Ugen, K.; Heller, R. Electroporation for Targeted Gene Transfer. *Expert Opin Drug Del* **2005**, 2 (2), 255–268. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.2.255>.
- (57) Hoover, F.; Magne Kalthovde, J. A Double-Injection DNA Electroporation Protocol to Enhance in Vivo Gene Delivery in Skeletal Muscle. *Anal Biochem* **2000**, 285 (1), 175–178. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4730>.
- (58) Titomirov, A. V.; Sukharev, S.; Kistanova, E. In Vivo Electroporation and Stable Transformation of Skin Cells of Newborn Mice by Plasmid DNA. *BBA-Gene Struct Expr* **1991**, 1088 (1), 131–134. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(91\)90162-F](https://doi.org/10.1016/0167-4781(91)90162-F).
- (59) Tomizawa, M.; Shinozaki, F.; Motoyoshi, Y.; Sugiyama, T.; Yamamoto, S.; Sueishi, M. Sonoporation: Gene Transfer Using Ultrasound. *World J Methodol* **2013**, 3 (4), 39–44. <https://doi.org/10.5662/wjm.v3.i4.39>.
- (60) Suda, T.; Liu, D. Hydrodynamic Gene Delivery: Its Principles and Applications. *Mol Ther* **2007**, 15 (12), 2063–2069. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300314>.
- (61) Tanelian, D. I.; Barry, M. a.; Johnston, S. a.; Le, T.; Smith, G. Controlled Gene Gun Delivery and Expression of DNA Within the Cornea. *BioTechniques* **1997**, 23 (3), 484–488. <https://doi.org/10.2144/97233st06>.
- (62) Krötz, F.; Wit, C. de; Sohn, H.-Y.; Zahler, S.; Gloe, T.; Pohl, U.; Plank, C. Magnetofection—A Highly Efficient Tool for Antisense Oligonucleotide Delivery in Vitro and in Vivo. *Mol Ther* **2003**, 7 (5), 700–710. [https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(03\)00065-0](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(03)00065-0).
- (63) Scherer, F.; Anton, M.; Schillinger, U.; Henke, J.; Bergemann, C.; Krüger, A.; Gänsbacher, B.; Plank, C. Magnetofection: Enhancing and Targeting Gene Delivery by Magnetic Force in Vitro and in Vivo. *Gene Ther* **2002**, 9 (2), 102–109. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301624>.
- (64) Cordelier, P.; Buscail, L. La thérapie génique : une réalité pour demain ? *Gastroen Clin Biol* **2005**, 29 (6–7), 724–731. <https://doi.org/GCB-6-7-2005-29-6-7-0399-8320-101019-200514449>.

- (65) 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.; Romana, S.; Radford-Weiss, I.; Gross, F.; Valensi, F.; Delabesse, E.; Macintyre, E.; Sigaux, F.; Soulier, J.; Leiva, L. E.; Wissler, M.; Prinz, C.; Rabbitts, T. H.; Le Deist, F.; Fischer, A.; Cavazzana-Calvo, M. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science* **2003**, *302* (5644), 415–419. <https://doi.org/10.1126/science.1088547>.
- (66) Thrasher, A. J.; Gaspar, H. B.; Baum, C.; Modlich, U.; Schambach, A.; Candotti, F.; Otsu, M.; Sorrentino, B.; Scobie, L.; Cameron, E.; Blyth, K.; Neil, J.; Abina, S. H.-B.; Cavazzana-Calvo, M.; Fischer, A. Gene Therapy: X-SCID Transgene Leukaemogenicity. *Nature* **2006**, *443* (7109), E5-6; discussion E6-7. <https://doi.org/10.1038/nature05219>.
- (67) Daya, S.; Berns, K. I. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clin Microbiol Rev* **2008**, *21* (4), 583–593. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-08>.
- (68) Les AAV, vecteurs de thérapie génique de choix dans les maladies neuromusculaires <https://www.afm-telathon.fr/actualites/aav-vecteurs-therapie-genique-choix-dans-maladies-neuromusculaires-140341> (accessed Apr 22, 2020).
- (69) Liu, W.; Liu, Z.; Liu, L.; Xiao, Z.; Cao, X.; Cao, Z.; Xue, L.; Miao, L.; He, X.; Li, W. A Novel Human Foamy Virus Mediated Gene Transfer of GAD67 Reduces Neuropathic Pain Following Spinal Cord Injury. *Neurosci. Lett.* **2008**, *432* (1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.11.054>.
- (70) Federici, T.; Kutner, R.; Zhang, X.-Y.; Kuroda, H.; Tordo, N.; Boulis, N. M.; Reiser, J. Comparative Analysis of HIV-1-Based Lentiviral Vectors Bearing Lyssavirus Glycoproteins for Neuronal Gene Transfer. *Genet Vaccines Ther* **2009**, *7*, 1. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-7-1>.
- (71) Betchen, S. A.; Kaplitt, M. Future and Current Surgical Therapies in Parkinson's Disease. *Curr. Opin. Neurol.* **2003**, *16* (4), 487–493. <https://doi.org/10.1097/01.wco.0000084227.82329.ae>.
- (72) D, M.; Hl, K. Gene Therapy with Poxvirus Vectors. *Curr Opin Mol Ther* **2005**, *7* (4), 317–325.
- (73) Baum, C.; Kustikova, O.; Modlich, U.; Li, Z.; Fehse, B. Mutagenesis and Oncogenesis by Chromosomal Insertion of Gene Transfer Vectors. *Hum. Gene Ther.* **2006**, *17* (3), 253–263. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.17.253>.
- (74) Bessis, N.; GarciaCozar, F. J.; Boissier, M.-C. Immune Responses to Gene Therapy Vectors: Influence on Vector Function and Effector Mechanisms. *Gene Ther.* **2004**, *11 Suppl 1*, S10-17. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302364>.
- (75) Thomas, C. E.; Ehrhardt, A.; Kay, M. A. Progress and Problems with the Use of Viral Vectors for Gene Therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4* (5), 346–358. <https://doi.org/10.1038/nrg1066>.
- (76) Sum, C.; Wettig, S.; Slavcev, R. Impact of DNA Vector Topology on Non-Viral Gene Therapeutic Safety and Efficacy. *CGT* **2014**, *14* (4), 309–329. <https://doi.org/10.2174/1566523214666140612154929>.
- (77) 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. *PNAS* **1987**, *84* (21), 7413–7417. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413>.
- (78) Zelphati, O.; Szoka, F. C. Mechanism of Oligonucleotide Release from Cationic Liposomes. *P Natl A Sci* **1996**, *93* (21), 11493–11498. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11493>.

- (79) Liang, W.; Lam, J. K. W. Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems. In *Molecular REgulation of Endocytosis*; IntechOpen, 2012.
- (80) Chu, C.-J.; Szoka, F. C. PH-Sensitive Liposomes. *J Lipos Res* **1994**, *4* (1), 361–395. <https://doi.org/10.3109/08982109409037050>.
- (81) Woodle, M. C.; Lasic, D. D. Sterically Stabilized Liposomes. *BBA-Rev Biomembranes* **1992**, *1113* (2), 171–199. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(92\)90038-C](https://doi.org/10.1016/0304-4157(92)90038-C).
- (82) Brück, A.; Abu-dahab, R.; Borchard, G.; Schäfer, U. F.; Lehr, C.-M. Lectin-Functionalized Liposomes for Pulmonary Drug Delivery: Interaction with Human Alveolar Epithelial Cells. *J Drug Target* **2001**, *9* (4), 241–251. <https://doi.org/10.3109/10611860108997933>.
- (83) Wu, G. Y.; Wu, C. H. Receptor-Mediated Gene Delivery and Expression in Vivo. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (29), 14621–14624.
- (84) Demeneix, B.; Behr, J. Polyethylenimine (PEI). In *Advances in Genetics; Non-Viral Vectors for Gene Therapy, Second Edition: Part 1*; Academic Press, 2005; Vol. 53, pp 215–230. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(05\)53008-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(05)53008-6).
- (85) Olins, D. E.; Olins, A. L.; Von Hippel, P. H. Model Nucleoprotein Complexes: Studies on the Interaction of Cationic Homopolypeptides with DNA. *J. Mol. Biol.* **1967**, *24* (2), 157–176. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90324-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90324-5).
- (86) Midoux, P.; Monsigny, M. Efficient Gene Transfer by Histidylated Polylysine/PDNA Complexes. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10* (3), 406–411. <https://doi.org/10.1021/bc9801070>.
- (87) Wolfert, M. A.; Seymour, L. W. Chloroquine and Amphipathic Peptide Helices Show Synergistic Transfection in Vitro. *Gene Ther.* **1998**, *5* (3), 409–414. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300606>.
- (88) Zhou, Y.; Li, Y. Studies of Interaction between Poly(Allylamine Hydrochloride) and Double Helix DNA by Spectral Methods. *Biophys Chem* **2004**, *107* (3), 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2003.09.009>.
- (89) Pathak, A.; Aggarwal, A.; Kurupati, R. K.; Patnaik, S.; Swami, A.; Singh, Y.; Kumar, P.; Vyas, S. P.; Gupta, K. C. Engineered Polyallylamine Nanoparticles for Efficient In Vitro Transfection. *Pharm Res* **2007**, *24* (8), 1427–1440. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9259-7>.
- (90) Boussif, O.; Delair, T.; Brua, C.; Veron, L.; Pavirani, A.; Kolbe, H. V. J. Synthesis of Polyallylamine Derivatives and Their Use as Gene Transfer Vectors in Vitro. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10* (5), 877–883. <https://doi.org/10.1021/bc9900439>.
- (91) Wytrwal, M.; Leduc, C.; Sarna, M.; Goncalves, C.; Kepczynski, M.; Midoux, P.; Nowakowska, M.; Pichon, C. Gene Delivery Efficiency and Intracellular Trafficking of Novel Poly(Allylamine) Derivatives. *Int J Pharm* **2015**, *478* (1), 372–382. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.053>.
- (92) Slita, A. V.; Kasyanenko, N. A.; Nazarova, O. V.; Gavrilova, I. I.; Eroпкина, E. M.; Sirotkin, A. K.; Smirnova, T. D.; Kiselev, O. I.; Panarin, E. F. DNA–Polycation Complexes Effect of Polycation Structure on Physico-Chemical and Biological Properties. *J Biotechnol* **2007**, *127* (4), 679–693. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.016>.
- (93) Dréan, M.; Debuigne, A.; Jérôme, C.; Goncalves, C.; Midoux, P.; Rieger, J.; Guégan, P. Poly(N-Methylvinylamine)-Based Copolymers for Improved Gene Transfection. *Macromol Biosci* **2018**, *18* (4), 1700353. <https://doi.org/10.1002/mabi.201700353>.
- (94) Luca, L. Naturally Occurring and Synthetic Imidazoles: Their Chemistry and Their Biological Activities. *CMC* **2006**, *13* (1), 1–23. <https://doi.org/10.2174/0929867310607010001>.

- (95) Burckhardt, G.; Zimmer, C.; Luck, G. Conformation and Reactivity of DNA in the Complex with Proteins. III. Helix-Coil Transition and Conformational Studies of Model Complexes of DNA's with Poly-L-Histidine. *Nucleic Acids Res.* **1976**, *3* (3), 537–559. <https://doi.org/10.1093/nar/3.3.537>.
- (96) Ihm, J.-E.; Han, K.-O.; Han, I.-K.; Ahn, K.-D.; Han, D.-K.; Cho, C.-S. High Transfection Efficiency of Poly(4-Vinylimidazole) as a New Gene Carrier. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14* (4), 707–708. <https://doi.org/10.1021/bc025611q>.
- (97) Putnam, D.; Zelikin, A. N.; Izumrudov, V. A.; Langer, R. Polyhistidine–PEG:DNA Nanocomposites for Gene Delivery. *Biomaterials* **2003**, *24* (24), 4425–4433. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00341-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00341-7).
- (98) Chu, D. S. H.; Schellinger, J. G.; Shi, J.; Convertine, A. J.; Stayton, P. S.; Pun, S. H. Application of Living Free Radical Polymerization for Nucleic Acid Delivery. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (7), 1089–1099. <https://doi.org/10.1021/ar200242z>.
- (99) Ho, H. T.; Bohec, M. L.; Frémaux, J.; Piogé, S.; Casse, N.; Fontaine, L.; Pascual, S. Tuning the Molar Composition of “Charge-Shifting” Cationic Copolymers Based on 2-(N,N-Dimethylamino)Ethyl Acrylate and 2-(Tert-Boc-Amino)Ethyl Acrylate. *Macromol. Rapid Comm.* **2017**, *38* (5), 1600641. <https://doi.org/10.1002/marc.201600641>.
- (100) Bohec, M. L.; Kenzo, K. B.; Piogé, S.; Mura, S.; Nicolas, J.; Casse, N.; Forcher, G.; Fontaine, L.; Pascual, S. Structure-PDNA Complexation and Structure–Cytotoxicity Relationships of PEGylated, Cationic Aminoethyl-Based Polyacrylates with Tunable Topologies. *Polym. Chem.* **2019**, *10* (15), 1968–1977. <https://doi.org/10.1039/C8PY01776J>.
- (101) Zidovetzki, R.; Levitan, I. Use of Cyclodextrins to Manipulate Plasma Membrane Cholesterol Content: Evidence, Misconceptions and Control Strategies. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768* (6), 1311–1324. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2007.03.026>.
- (102) Mellet, C. O.; Fernández, J. M. G.; Benito, J. M. Cyclodextrin-Based Gene Delivery Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (3), 1586–1608. <https://doi.org/10.1039/C0CS00019A>.
- (103) Jessel, N. B.; Schwinté, P.; Donohue, R.; Lavalle, P.; Boulmedais, F.; Darcy, R.; Szalontai, B.; Voegel, J.-C.; Ogier, J. Pyridylamino- β -Cyclodextrin as a Molecular Chaperone for Lipopolysaccharide Embedded in a Multilayered Polyelectrolyte Architecture. *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14* (10), 963–969. <https://doi.org/10.1002/adfm.200305089>.
- (104) Bennevault-Celton, V.; Urbach, A.; Martin, O.; Pichon, C.; Guégan, P.; Midoux, P. Supramolecular Assemblies of Histidinylated α -Cyclodextrin in the Presence of DNA Scaffold during CDplexes Formation. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (12), 2404–2414. <https://doi.org/10.1021/bc200167p>.
- (105) Huang, H.; Tang, G.; Wang, Q.; Li, D.; Shen, F.; Zhou, J.; Yu, H. Two Novel Non-Viral Gene Delivery Vectors: Low Molecular Weight Polyethylenimine Cross-Linked by (2-Hydroxypropyl)- β -Cyclodextrin or (2-Hydroxypropyl)- γ -Cyclodextrin. *Chem. Comm.* **2006**, No. 22, 2382–2384. <https://doi.org/10.1039/B601130F>.
- (106) Cao, Y.; Tan, Y. F.; Wong, Y. S.; Liew, M. W. J.; Venkatraman, S. Recent Advances in Chitosan-Based Carriers for Gene Delivery. *Mar. Drugs* **2019**, *17* (6), 381. <https://doi.org/10.3390/md17060381>.
- (107) Germershaus, O.; Mao, S.; Sitterberg, J.; Bakowsky, U.; Kissel, T. Gene Delivery Using Chitosan, Trimethyl Chitosan or Polyethylenglycol-Graft-Trimethyl Chitosan Block Copolymers: Establishment of Structure-Activity Relationships in Vitro. *J. Control. Release* **2008**, *125* (2), 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.10.013>.

- (108) Mansouri, S.; Cuie, Y.; Winnik, F.; Shi, Q.; Lavigne, P.; Benderdour, M.; Beaumont, E.; Fernandes, J. C. Characterization of Folate-Chitosan-DNA Nanoparticles for Gene Therapy. *Biomaterials* **2006**, *27* (9), 2060–2065. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.020>.
- (109) Willner, I.; Eichen, Y.; Frank, A. J.; Fox, M. A. Photoinduced Electron-Transfer Processes Using Organized Redox-Functionalized Bipyridinium-Polyethylenimine-Titania Colloids and Particulate Assemblies. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (28), 7264–7271. <https://doi.org/10.1021/j100130a024>.
- (110) Curtis, K. A.; Miller, D.; Millard, P.; Basu, S.; Horkay, F.; Chandran, P. L. Unusual Salt and PH Induced Changes in Polyethylenimine Solutions. *PLoS One* **2016**, *11* (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158147>.
- (111) Yuan, J.-J.; Jin, R.-H. Fibrous Crystalline Hydrogels Formed from Polymers Possessing A Linear Poly(Ethyleneimine) Backbone. *Langmuir* **2005**, *21* (7), 3136–3145. <https://doi.org/10.1021/la047182l>.
- (112) Roark, D. N.; McKusick, B. C.; Steuerle, U. Aziridines. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2000. https://doi.org/10.1002/14356007.a03_239.
- (113) Wågberg, L. Polyelectrolyte Adsorption onto Cellulose Fibres – A Review. *Nord Pulp Par. Res. J.* **2000**, *15* (5), 586–597. <https://doi.org/10.3183/npprj-2000-15-05-p586-597>.
- (114) Satyapal, S.; Filburn, T.; Trela, J.; Strange, J. Performance and Properties of a Solid Amine Sorbent for Carbon Dioxide Removal in Space Life Support Applications. *Energy Fuels* **2001**, *15* (2), 250–255. <https://doi.org/10.1021/ef0002391>.
- (115) Dick, C. R.; Ham, G. E. Characterization of Polyethylenimine. *J Macromol Sci A* **1970**, *4* (6), 1301–1314. <https://doi.org/10.1080/00222337008081731>.
- (116) Gembitskii, P. A.; Chmarin, A. I.; Kleshcheva, N. A.; Zhuk, D. S. The Polymerization of Ethylenimine to Give Linear Polyethylenimine. *Polym. Sci. USSR* **1978**, *20* (7), 1695–1702. [https://doi.org/10.1016/0032-3950\(78\)90424-0](https://doi.org/10.1016/0032-3950(78)90424-0).
- (117) Weyts, K. F.; Goethals, E. J. New Synthesis of Linear Polyethyleneimine. *Polym. Bull.* **1988**, *19* (1), 13–19. <https://doi.org/10.1007/BF00255018>.
- (118) Andreasch, R. Zur Kenntniss des Allylharnstoffs. *Monatsh Chem* **1884**, *5* (1), 33–46. <https://doi.org/10.1007/BF01526087>.
- (119) Gabriel, S. Zur Kenntniss Des Bromäthylamins. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1889**, *22* (1), 1139–1154. <https://doi.org/10.1002/cber.188902201248>.
- (120) Tomalia, D. A.; Sheetz, D. P. Homopolymerization of 2-Alkyl- and 2-Aryl-2-Oxazolines. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **1966**, *4* (9), 2253–2265. <https://doi.org/10.1002/pol.1966.150040919>.
- (121) Seeliger, W.; Aufderhaar, E.; Diepers, W.; Feinauer, R.; Nehring, R.; Thier, W.; Hellmann, H. Recent Syntheses and Reactions of Cyclic Imidic Esters. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1966**, *5* (10), 875–888. <https://doi.org/10.1002/anie.196608751>.
- (122) Bassiri, T. G.; Levy, A.; Litt, M. Polymerization of Cyclic Imino Ethers. I. Oxazolines. *J. Polym. Sci. Pol. Lett.* **1967**, *5* (9), 871–879. <https://doi.org/10.1002/pol.1967.110050927>.
- (123) Kagiya, T.; Narisawa, S.; Maeda, T.; Fukui, K. Ring-Opening Polymerization of 2-Substituted 2-Oxazolines. *J. Polym. Sci. Pol. Lett.* **1966**, *4* (7), 441–445. <https://doi.org/10.1002/pol.1966.110040701>.
- (124) Matyjaszewski, K. Introduction to Living Polymeriz. Living and/or Controlled Polymerization. *J. Phys. Org. Chem.* **1995**, *8* (4), 197–207. <https://doi.org/10.1002/poc.610080403>.

- (125) Plet, L.; Delecourt, G.; Hanafi, M.; Pantoustier, N.; Pembouong, G.; Midoux, P.; Bennevault, V.; Guégan, P. Controlled Star Poly(2-Oxazoline)s: Synthesis, Characterization. *Eur. Polym. J.* **2020**, *122*, 109323. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109323>.
- (126) Guillerm, B.; Monge, S.; Lapinte, V.; Robin, J.-J. How to Modulate the Chemical Structure of Polyoxazolines by Appropriate Functionalization. *Macromol. Rapid Comm.* **2012**, *33* (19), 1600–1612. <https://doi.org/10.1002/marc.201200266>.
- (127) Verbraeken, B.; Monnery, B. D.; Lava, K.; Hoogenboom, R. The Chemistry of Poly(2-Oxazoline)s. *Eur. Polym. J.* **2017**, *88*, 451–469. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.11.016>.
- (128) Saegusa, T.; Ikeda, H.; Fujii, H. Isomerization Polymerization of 2-Oxazoline. V. Kinetic Studies on the Polymerization of 2-Oxazoline. *Macromolecules* **1973**, *6* (3), 315–319. <https://doi.org/10.1021/ma60033a002>.
- (129) Nuyken, O.; Maier, G.; Groß, A.; Fischer, H. Systematic Investigations on the Reactivity of Oxazolinium Salts. *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, *197* (1), 83–95. <https://doi.org/10.1002/macp.1996.021970106>.
- (130) Glassner, M.; Vergaelen, M.; Hoogenboom, R. Poly(2-Oxazoline)s: A Comprehensive Overview of Polymer Structures and Their Physical Properties. *Polym. Int.* **2018**, *67* (1), 32–45. <https://doi.org/10.1002/pi.5457>.
- (131) Hoogenboom, R. Poly(2-Oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2009**, *48* (43), 7978–7994. <https://doi.org/10.1002/anie.200901607>.
- (132) Sedlacek, O.; Monnery, B. D.; Filippov, S. K.; Hoogenboom, R.; Hruby, M. Poly(2-Oxazoline)s – Are They More Advantageous for Biomedical Applications Than Other Polymers? *Macromol. Rapid Comm.* **2012**, *33* (19), 1648–1662. <https://doi.org/10.1002/marc.201200453>.
- (133) Lorson, T.; Lübtow, M. M.; Wegener, E.; Haider, M. S.; Borova, S.; Nahm, D.; Jordan, R.; Sokolski-Papkov, M.; Kabanov, A. V.; Luxenhofer, R. Poly(2-Oxazoline)s Based Biomaterials: A Comprehensive and Critical Update. *Biomaterials* **2018**, *178*, 204–280. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.05.022>.
- (134) Luxenhofer, R.; Schulz, A.; Roques, C.; Li, S.; Bronich, T. K.; Batrakova, E. V.; Jordan, R.; Kabanov, A. V. Doubly Amphiphilic Poly(2-Oxazoline)s as High-Capacity Delivery Systems for Hydrophobic Drugs. *Biomaterials* **2010**, *31* (18), 4972–4979. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.057>.
- (135) Legros, C.; De Pauw-Gillet, M.-C.; Tam, K. C.; Taton, D.; Lecommandoux, S. Crystallisation-Driven Self-Assembly of Poly(2-Isopropyl-2-Oxazoline)-Block-Poly(2-Methyl-2-Oxazoline) above the LCST. *Soft Matter* **2015**, *11* (17), 3354–3359. <https://doi.org/10.1039/C5SM00313J>.
- (136) Krumm, C.; Fik, C. P.; Meuris, M.; Dropalla, G. J.; Geltenpoth, H.; Sickmann, A.; Tiller, J. C. Well-Defined Amphiphilic Poly(2-Oxazoline) ABA-Triblock Copolymers and Their Aggregation Behavior in Aqueous Solution. *Macromol. Rapid Comm.* **2012**, *33* (19), 1677–1682. <https://doi.org/10.1002/marc.201200192>.
- (137) Luxenhofer, R.; Jordan, R. Click Chemistry with Poly(2-Oxazoline)s. *Macromolecules* **2006**, *39* (10), 3509–3516. <https://doi.org/10.1021/ma052515m>.
- (138) Saegusa, T.; Ikeda, H.; Fujii, H. Crystalline Polyethylenimine. *Macromolecules* **1972**, *5* (1), 108–108. <https://doi.org/10.1021/ma60025a029>.
- (139) Kem, K. M. Kinetics of the Hydrolysis of Linear Poly[(Acylimino)-Ethylenes]. *J. Polym. Sci* **1979**, *17* (7), 1977–1990. <https://doi.org/10.1002/pol.1979.170170708>.
- (140) Lambermont-Thijs, H. M. L.; van der Woerd, F. S.; Baumgaertel, A.; Bonami, L.; Du Prez, F. E.; Schubert, U. S.; Hoogenboom, R. Linear Poly(Ethylene Imine)s by Acidic

- Hydrolysis of Poly(2-Oxazoline)s: Kinetic Screening, Thermal Properties, and Temperature-Induced Solubility Transitions. *Macromolecules* **2010**, *43* (2), 927–933. <https://doi.org/10.1021/ma9020455>.
- (141) von Gersdorff, K.; Sanders, N. N.; Vandenbroucke, R.; De Smedt, S. C.; Wagner, E.; Ogris, M. The Internalization Route Resulting in Successful Gene Expression Depends on Both Cell Line and Polyethylenimine Polyplex Type. *Mol. Ther.* **2006**, *14* (5), 745–753. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.07.006>.
- (142) Abdallah, B.; Hassan, A.; Benoist, C.; Goula, D.; Behr, J. P.; Demeneix, B. A. A Powerful Nonviral Vector for In Vivo Gene Transfer into the Adult Mammalian Brain: Polyethylenimine. *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7* (16), 1947–1954. <https://doi.org/10.1089/hum.1996.7.16-1947>.
- (143) Rinkenauer, A. C.; Vollrath, A.; Schallon, A.; Tauhardt, L.; Kempe, K.; Schubert, S.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Parallel High-Throughput Screening of Polymer Vectors for Nonviral Gene Delivery: Evaluation of Structure–Property Relationships of Transfection. *ACS Comb. Sci.* **2013**, *15* (9), 475–482. <https://doi.org/10.1021/co400025u>.
- (144) Cortez, M. A.; Godbey, W. T.; Fang, Y.; Payne, M. E.; Cafferty, B. J.; Kosakowska, K. A.; Grayson, S. M. The Synthesis of Cyclic Poly(Ethylene Imine) and Exact Linear Analogues: An Evaluation of Gene Delivery Comparing Polymer Architectures. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (20), 6541–6549. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b00980>.
- (145) Brissault, B.; Leborgne, C.; Guis, C.; Danos, O.; Cheradame, H.; Kichler, A. Linear Topology Confers in Vivo Gene Transfer Activity to Polyethylenimines. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17* (3), 759–765. <https://doi.org/10.1021/bc050287v>.
- (146) Uduehi, A. N.; Stammberger, U.; Schmid, R. A. Efficiency of Non-Viral Gene Delivery Systems to Rat Lungs. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **2001**, *20* (1), 159–163. [https://doi.org/10.1016/S1010-7940\(01\)00714-X](https://doi.org/10.1016/S1010-7940(01)00714-X).
- (147) Kafil, V.; Omid, Y. Cytotoxic Impacts of Linear and Branched Polyethylenimine Nanostructures in A431 Cells. *Bioimpacts* **2011**, *1* (1), 23–30. <https://doi.org/10.5681/bi.2011.004>.
- (148) Okon, E. U.; Hammed, G.; Wafa, P. A. E.; Abraham, O.; Case, N.; Henry, E. In-Vitro Cytotoxicity of Polyethyleneimine on HeLa and Vero Cells. *IJIAS* **2014**, *5* (3), 192–199.
- (149) Morimoto, K.; Nishikawa, M.; Kawakami, S.; Nakano, T.; Hattori, Y.; Fumoto, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. Molecular Weight-Dependent Gene Transfection Activity of Unmodified and Galactosylated Polyethyleneimine on Hepatoma Cells and Mouse Liver. *Mol. Ther.* **2003**, *7* (2), 254–261. [https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(02\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(02)00053-9).
- (150) Bahrami, B.; Hojjat-Farsangi, M.; Mohammadi, H.; Anvari, E.; Ghalamfarsa, G.; Yousefi, M.; Jadidi-Niaragh, F. Nanoparticles and Targeted Drug Delivery in Cancer Therapy. *Immunol. Lett* **2017**, *190*, 64–83. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.015>.
- (151) Jiang, C.; Chen, J.; Li, Z.; Wang, Z.; Zhang, W.; Liu, J. Recent Advances in the Development of Polyethylenimine-Based Gene Vectors for Safe and Efficient Gene Delivery. *Expert Opin. Drug. Del.* **2019**, *16* (4), 363–376. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1604681>.
- (152) Giardi, C.; Lapinte, V.; Charnay, C.; Robin, J. J. Nonionic Polyoxazoline Surfactants Based on Renewable Source: Synthesis, Surface and Bulk Properties. *React. Funct. Polym.* **2009**, *69*, 643–649. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2009.04.008>.
- (153) Takasu, A.; Kojima, H. Synthesis and Ring-Opening Polymerizations of Novel S-Glycooxazolines. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48* (24), 5953–5960. <https://doi.org/10.1002/pola.24411>.

- (154) Korchia, L.; Bouilhac, C.; Aubert, A.; Robin, J.-J.; Lapinte, V. Light-Switchable Nanoparticles Based on Amphiphilic Diblock, Triblock and Heterograft Polyoxazoline. *RSC Advances* **2017**, *7* (68), 42690–42698. <https://doi.org/10.1039/C7RA07094B>.
- (155) Xie, Y.; Kim, N. H.; Nadithe, V.; Schalk, D.; Thakur, A.; Kılıç, A.; Lum, L. G.; Bassett, D. J. P.; Merkel, O. M. Targeted Delivery of siRNA to Activated T Cells via Transferrin-Polyethylenimine (Tf-PEI) as a Potential Therapy of Asthma. *J. Control. Release* **2016**, *229*, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.029>.
- (156) Diehl, C.; Schlaad, H. Thermo-Responsive Polyoxazolines with Widely Tuneable LCST. *Macromol Biosci.* **2009**, *9* (2), 157–161. <https://doi.org/10.1002/mabi.200800213>.
- (157) Pons, B.; Mouhoubi, L.; Adib, A.; Godzina, P.; Behr, J.-P.; Zuber, G. ω -Hydrazino Linear Polyethylenimine: A Monoconjugation Building Block for Nucleic Acid Delivery. *ChemBioChem.* **2006**, *7* (2), 303–309. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500349>.
- (158) Delaittre, G. Telechelic Poly(2-Oxazoline)s. *Eur. Polym. J.* **2019**, *121*, 109281. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109281>.
- (159) Jäger, M.; Schubert, S.; Ochrimenko, S.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Branched and Linear Poly(Ethylene Imine)-Based Conjugates: Synthetic Modification, Characterization, and Application. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (13), 4755–4767. <https://doi.org/10.1039/C2CS35146C>.
- (160) Mees, M. A.; Hoogenboom, R. Full and Partial Hydrolysis of Poly(2-Oxazoline)s and the Subsequent Post-Polymerization Modification of the Resulting Polyethylenimine (Co)Polymers. *Polym. Chem.* **2018**, *9* (40), 4968–4978. <https://doi.org/10.1039/C8PY00978C>.
- (161) Rossegger, E.; Schenk, V.; Wiesbrock, F. Design Strategies for Functionalized Poly(2-Oxazoline)s and Derived Materials. *Polymers* **2013**, *5* (3), 956–1011. <https://doi.org/10.3390/polym5030956>.
- (162) Dufès, C.; Al Robaian, M.; Somani, S. Transferrin and the Transferrin Receptor for the Targeted Delivery of Therapeutic Agents to the Brain and Cancer Cells. *Ther. Deliv.* **2013**, *4* (5), 629–640. <https://doi.org/10.4155/tde.13.21>.
- (163) Assaraf, Y. G.; Leamon, C. P.; Reddy, J. A. The Folate Receptor as a Rational Therapeutic Target for Personalized Cancer Treatment. *Drug Resist. Updat.* **2014**, *17* (4–6), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2014.10.002>.
- (164) Cao, M.; Gao, Y.; Qiu, N.; Shen, Y.; Shen, P. Folic Acid Directly Modified Low Molecular Weight of Polyethyleneimine for Targeted PDNA Delivery. *J. Drug. Deliv. Sci. Tec.* **2020**, *56*, 101522. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101522>.
- (165) Bertrand, E.; Gonçalves, C.; Billiet, L.; Gomez, J. P.; Pichon, C.; Cheradame, H.; Midoux, P.; Guégan, P. Histidinylated Linear PEI: A New Efficient Non-Toxic Polymer for Gene Transfer. *Chem. Comm. (Camb.)* **2011**, *47* (46), 12547–12549. <https://doi.org/10.1039/c1cc15716g>.
- (166) Ihm, J. E.; Krier, I.; Lim, J. M.; Shim, S.; Han, D. K.; Hubbell, J. A. Improved Biocompatibility of Polyethylenimine (PEI) as a Gene Carrier by Conjugating Urocanic Acid: In Vitro and in Vivo. *Macromol. Res.* **2015**, *23* (4), 387–395. <https://doi.org/10.1007/s13233-015-3047-8>.
- (167) Liu, Z.; Zhang, Z.; Zhou, C.; Jiao, Y. Hydrophobic Modifications of Cationic Polymers for Gene Delivery. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35* (9), 1144–1162. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.007>.
- (168) Nam, J.-P.; Nah, J.-W. Target Gene Delivery from Targeting Ligand Conjugated Chitosan–PEI Copolymer for Cancer Therapy. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *135*, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.053>.

- (169) Ochrimenko, S.; Vollrath, A.; Tauhardt, L.; Kempe, K.; Schubert, S.; Schubert, U. S.; Fischer, D. Dextran-Graft-Linear Poly(Ethylene Imine)s for Gene Delivery: Importance of the Linking Strategy. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *113*, 597–606. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.048>.
- (170) Maity, S.; Choudhary, P.; Manjunath, M.; Kulkarni, A.; Murthy, N. A Biodegradable Adamantane Polymer with Ketal Linkages in Its Backbone for Gene Therapy. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (88), 15956–15959. <https://doi.org/10.1039/C5CC05242D>.
- (171) Oskuee, R. K.; Dehshahri, A.; Shier, W. T.; Ramezani, M. Alkylcarboxylate Grafting to Polyethylenimine: A Simple Approach to Producing a DNA Nanocarrier with Low Toxicity. *J. Gene Med.* **2009**, *11* (10), 921–932. <https://doi.org/10.1002/jgm.1374>.
- (172) Jiang, H.-L.; Islam, M. A.; Xing, L.; Firdous, J.; Cao, W.; He, Y.-J.; Zhu, Y.; Cho, K.-H.; Li, H.-S.; Cho, C.-S. Degradable Polyethylenimine-Based Gene Carriers for Cancer Therapy. *Polymeric Gene Delivery Systems* **2017**, 113–148. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77866-2_5.
- (173) Park, E.; Cho, H.-B.; Takimoto, K. Effective Gene Delivery into Adipose-Derived Stem Cells: Transfection of Cells in Suspension with the Use of a Nuclear Localization Signal Peptide-Conjugated Polyethylenimine. *Cytotherapy* **2015**, *17* (5), 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.11.008>.
- (174) Midoux, P.; Pigeon, L.; Gonçalves, C.; Pichon, C. Peptides mediating DNA transport on microtubules and their impact on non-viral gene transfer efficiency. *Biosci. Rep.* **2017**, *37* (5). <https://doi.org/10.1042/BSR20170995>.
- (175) Hayek, A.; Ercelen, S.; Zhang, X.; Bolze, F.; Nicoud, J.-F.; Schaub, E.; Baldeck, P. L.; Mély, Y. Conjugation of a New Two-Photon Fluorophore to Poly(Ethyleneimine) for Gene Delivery Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18* (3), 844–851. <https://doi.org/10.1021/bc060362h>.
- (176) Clamme, J.-P.; Krishnamoorthy, G.; Mély, Y. Intracellular Dynamics of the Gene Delivery Vehicle Polyethylenimine during Transfection: Investigation by Two-Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy. *BBA-Biomembranes* **2003**, *1617* (1), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.09.002>.
- (177) D'Andrea, C.; Pezzoli, D.; Malloggi, C.; Candeo, A.; Capelli, G.; Bassi, A.; Volonterio, A.; Taroni, P.; Candiani, G. The Study of Polyplex Formation and Stability by Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy of SYBR Green I-Stained DNA. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13* (12), 1680–1689. <https://doi.org/10.1039/C4PP00242C>.
- (178) Pigeon, L.; Gonçalves, C.; Pichon, C.; Midoux, P. Evidence for Plasmid DNA Exchange after Polyplex Mixing. *Soft Matter* **2016**, *12* (33), 7012–7019. <https://doi.org/10.1039/C6SM00575F>.
- (179) Knipe, J. M.; Peters, J. T.; Peppas, N. A. Theranostic Agents for Intracellular Gene Delivery with Spatiotemporal Imaging. *Nano Today* **2013**, *8* (1), 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2012.12.004>.
- (180) Wan, Q.; Xie, L.; Gao, L.; Wang, Z.; Nan, X.; Lei, H.; Long, X.; Chen, Z.-Y.; He, C.-Y.; Liu, G.; Liu, X.; Qiu, B. Self-Assembled Magnetic Theranostic Nanoparticles for Highly Sensitive MRI of Minicircle DNA Delivery. *Nanoscale* **2012**, *5* (2), 744–752. <https://doi.org/10.1039/C2NR32438E>.
- (181) Lee, M.-Y.; Park, S.-J.; Park, K.; Kim, K. S.; Lee, H.; Hahn, S. K. Target-Specific Gene Silencing of Layer-by-Layer Assembled Gold-Cysteamine/SiRNA/PEI/HA Nanocomplex. *ACS Nano* **2011**, *5* (8), 6138–6147. <https://doi.org/10.1021/nn2017793>.
- (182) and, H. D.; Nie*, S. Cell-Penetrating Quantum Dots Based on Multivalent and Endosome-Disrupting Surface Coatings <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja068158s> (accessed Apr 22, 2020). <https://doi.org/10.1021/ja068158s>.

- (183) Keil, T. W. M.; Baldassi, D.; Merkel, O. M. T-Cell Targeted Pulmonary SiRNA Delivery for the Treatment of Asthma. *WIREs Nanomed. nanobi.* **2020**, *n/a* (n/a), e1634. <https://doi.org/10.1002/wnan.1634>.
- (184) Kandil, R.; Xie, Y.; Heermann, R.; Isert, L.; Jung, K.; Mehta, A.; Merkel, O. M. Coming in and Finding Out: Blending Receptor-Targeted Delivery and Efficient Endosomal Escape in a Novel Bio-Responsive SiRNA Delivery System for Gene Knockdown in Pulmonary T Cells. *Adv. Ther.* **2019**, *2* (7), 1900047. <https://doi.org/10.1002/adtp.201900047>.
- (185) Kolate, A.; Baradia, D.; Patil, S.; Vhora, I.; Kore, G.; Misra, A. PEG — A Versatile Conjugating Ligand for Drugs and Drug Delivery Systems. *J. Control. Release* **2014**, *192*, 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.046>.
- (186) Abuchowski, A.; McCoy, J. R.; Palczuk, N. C.; Es, T. van; Davis, F. F. Effect of Covalent Attachment of Polyethylene Glycol on Immunogenicity and Circulating Life of Bovine Liver Catalase. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252* (11), 3582–3586.
- (187) Suk, J. S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L. M. PEGylation as a Strategy for Improving Nanoparticle-Based Drug and Gene Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>.
- (188) Salameh, J. W.; Zhou, L.; Ward, S. M.; Chalarca, C. F. S.; Emrick, T.; Figueiredo, M. L. Polymer-Mediated Gene Therapy: Recent Advances and Merging of Delivery Techniques. *WIREs Nanomed. nanobi.* **2020**, *12* (2), e1598. <https://doi.org/10.1002/wnan.1598>.
- (189) Zhang, X.; Pan, S.-R.; Hu, H.-M.; Wu, G.-F.; Feng, M.; Zhang, W.; Luo, X. Poly(Ethylene Glycol)-Block-Polyethylenimine Copolymers as Carriers for Gene Delivery: Effects of PEG Molecular Weight and PEGylation Degree. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *84A* (3), 795–804. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31343>.
- (190) Smith, R. J.; Beck, R. W.; Prevette, L. E. Impact of Molecular Weight and Degree of Conjugation on the Thermodynamics of DNA Complexation and Stability of Polyethylenimine-Graft-Poly(Ethylene Glycol) Copolymers. *Biophys. Chem.* **2015**, *203–204*, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2015.04.005>.
- (191) Brissault, B.; Kichler, A.; Leborgne, C.; Danos, O.; Cheradame, H.; Gau, J.; Auvray, L.; Guis, C. Synthesis, Characterization, and Gene Transfer Application of Poly(Ethylene Glycol-b-Ethylenimine) with High Molar Mass Polyamine Block. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (10), 2863–2870. <https://doi.org/10.1021/bm060499a>.
- (192) Luo, X.; Peng, X.; Hou, J.; Wu, S.; Shen, J.; Wang, L. Folic Acid-Functionalized Polyethylenimine Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Theranostic Agents for Magnetic Resonance Imaging and PD-L1 SiRNA Delivery for Gastric Cancer. *IJN* **2017**, *Volume 12*, 5331–5343. <https://doi.org/10.2147/IJN.S137245>.
- (193) Guo, W.; Lee, R. J. Receptor-Targeted Gene Delivery Viafolate-Conjugated Polyethylenimine. *AAPS PharmSci.* **1999**, *1* (4), 20–26. <https://doi.org/10.1208/ps010419>.
- (194) 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 Therapy* **1999**, *6* (4), 595–605. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300900>.
- (195) Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Poly(Ethylene Glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2010**, *49* (36), 6288–6308. <https://doi.org/10.1002/anie.200902672>.
- (196) Zhang, P.; Sun, F.; Liu, S.; Jiang, S. Anti-PEG Antibodies in the Clinic: Current Issues and beyond PEGylation. *J. Control. Release* **2016**, *244*, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.040>.

- (197) Yang, Q.; Lai, S. K. Anti-PEG Immunity: Emergence, Characteristics, and Unaddressed Questions. *WIREs Nanomed. nanobi.* **2015**, *7* (5), 655–677. <https://doi.org/10.1002/wnan.1339>.
- (198) Ishida, T.; Kiwada, H. Accelerated Blood Clearance (ABC) Phenomenon upon Repeated Injection of PEGylated Liposomes. *Int. J. Pharm.* **2008**, *354* (1–2), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.005>.
- (199) Viegas, T. X.; Bentley, M. D.; Harris, J. M.; Fang, Z.; Yoon, K.; Dizman, B.; Weimer, R.; Mero, A.; Pasut, G.; Veronese, F. M. Polyoxazoline: Chemistry, Properties, and Applications in Drug Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (5), 976–986. <https://doi.org/10.1021/bc200049d>.
- (200) Abbina, S.; Parambath, A. 14 - PEGylation and Its Alternatives: A Summary. In *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems*; Parambath, A., Ed.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, 2018; pp 363–376. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101750-0.00014-3>.
- (201) *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems: Beyond Polyethylene Glycol*, 1 edition.; Parambath, A., Ed.; Woodhead Publishing: Duxford, United Kingdom, 2018.
- (202) Moreadith, R. W.; Viegas, T. X.; Bentley, M. D.; Harris, J. M.; Fang, Z.; Yoon, K.; Dizman, B.; Weimer, R.; Rae, B. P.; Li, X.; Rader, C.; Standaert, D.; Olanow, W. Clinical Development of a Poly(2-Oxazoline) (POZ) Polymer Therapeutic for the Treatment of Parkinson’s Disease – Proof of Concept of POZ as a Versatile Polymer Platform for Drug Development in Multiple Therapeutic Indications. *Eur. Polym. J.* **2017**, *88*, 524–552. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.09.052>.
- (203) Bludau, H.; Czapar, A. E.; Pitek, A. S.; Shukla, S.; Jordan, R.; Steinmetz, N. F. POxylation as an Alternative Stealth Coating for Biomedical Applications. *Eur. Polym. J.* **2017**, *88*, 679–688. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.10.041>.
- (204) Morgese, G.; Benetti, E. M. Polyoxazoline Biointerfaces by Surface Grafting. *Eur. Polym. J.* **2017**, *88*, 470–485. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.11.003>.
- (205) Goddard, P.; Hutchinson, L. E.; Brown, J.; Brookman, L. J. Soluble Polymeric Carriers for Drug Delivery. Part 2. Preparation and in Vivo Behaviour of N-Acylethylenimine Copolymers. *J. Control. Release* **1989**, *10* (1), 5–16. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(89\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0168-3659(89)90013-8).
- (206) Zalipsky, S.; Hansen, C. B.; Oaks, J. M.; Allen, T. M. Evaluation of Blood Clearance Rates and Biodistribution of Poly(2-Oxazoline)-Grafted Liposomes. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85* (2), 133–137. <https://doi.org/10.1021/js9504043>.
- (207) Konradi, R.; Acikgoz, C.; Textor, M. Polyoxazolines for Nonfouling Surface Coatings — A Direct Comparison to the Gold Standard PEG. *Macromol. Rapid Comm.* **2012**, *33* (19), 1663–1676. <https://doi.org/10.1002/marc.201200422>.
- (208) Einzmann, M.; Binder, W. H. Novel Functional Initiators for Oxazoline Polymerization. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2001**, *39* (16), 2821–2831. <https://doi.org/10.1002/pola.1262>.
- (209) Fruijtier-Pölloth, C. Safety Assessment on Polyethylene Glycols (PEGs) and Their Derivatives as Used in Cosmetic Products. *Toxicology* **2005**, *214* (1), 1–38. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.001>.
- (210) Kuringen, H. P. C. V.; Lenoir, J.; Adriaens, E.; Bender, J.; Geest, B. G. D.; Hoogenboom, R. Partial Hydrolysis of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) and Potential Implications for Biomedical Applications? *Macromol. Biosci.* **2012**, *12* (8), 1114–1123. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200080>.
- (211) de la Rosa, V. R.; Bauwens, E.; Monnery, B. D.; De Geest, B. G.; Hoogenboom, R. Fast and Accurate Partial Hydrolysis of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) into Tailored Linear

- Polyethylenimine Copolymers. *Polym. Chem.* **2014**, 5 (17), 4957–4964. <https://doi.org/10.1039/C4PY00355A>.
- (212) Fernandes, J. C.; Qiu, X.; Winnik, F. M.; Benderdour, M.; Zhang, X.; Dai, K.; Shi, Q. Linear Polyethylenimine Produced by Partial Acid Hydrolysis of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) for DNA and SiRNA Delivery in Vitro. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, 8, 4091–4102. <https://doi.org/10.2147/IJN.S47413>.
- (213) Bauer, M.; Tauhardt, L.; Lambermont-Thijs, H. M. L.; Kempe, K.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S.; Fischer, Dagmar. Rethinking the Impact of the Protonable Amine Density on Cationic Polymers for Gene Delivery: A Comparative Study of Partially Hydrolyzed Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)s and Linear Poly(Ethylene Imine)s. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, 133, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.003>.
- (214) Vlasi, E.; Pispas, S. Solution Behavior of Hydrolyzed Gradient Methyl/Phenyl Oxazoline Copolymers and Complexation with DNA. *Macromol. Chem. Phys.* **2015**, 216 (8), 873–883. <https://doi.org/10.1002/macp.201400552>.
- (215) Hsiue, G.-H.; Chiang, H.-Z.; Wang, C.-H.; Juang, T.-M. Nonviral Gene Carriers Based on Diblock Copolymers of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) and Linear Polyethylenimine. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17 (3), 781–786. <https://doi.org/10.1021/bc050317u>.
- (216) Haladjova, E.; Halacheva, S.; Momekova, D.; Moskova-Doumanova, V.; Topouzova-Hristova, T.; Mladenova, K.; Doumanov, J.; Petrova, M.; Rangelov, S. Polyplex Particles Based on Comb-Like Polyethylenimine/Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) Copolymers: Relating Biological Performance with Morphology and Structure. *Macromol. Biosci.* **2018**, 18 (4), 1700349. <https://doi.org/10.1002/mabi.201700349>.
- (217) Lambermont-Thijs, H. M. L.; Heuts, J. P. A.; Hoepfener, S.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. Selective Partial Hydrolysis of Amphiphilic Copoly(2-Oxazoline)s as Basis for Temperature and PH Responsive Micelles. *Polym. Chem.* **2011**, 2 (2), 313–322. <https://doi.org/10.1039/C0PY00052C>.
- (218) Litt, M. H.; Lin, C. S. Selective Hydrolysis of Oxazoline Block Copolymers. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **1992**, 30 (5), 779–786. <https://doi.org/10.1002/pola.1992.080300507>.
- (219) van Kuringen, H. P. C.; de la Rosa, V. R.; Fijten, M. W. M.; Heuts, J. P. A.; Hoogenboom, R. Enhanced Selectivity for the Hydrolysis of Block Copoly(2-Oxazoline)s in Ethanol-Water Resulting in Linear Poly(Ethylene Imine) Copolymers. *Macromol. Rapid Comm.* **2012**, 33 (9), 827–832. <https://doi.org/10.1002/marc.201200046>.
- (220) Hess, M.; Jones, R. G.; Kahovec, J.; Kitayama, T.; Kratochvíl, P.; Kubisa, P.; Mormann, W.; Stepto, R. F. T.; Tabak, D.; Vohlídál, J.; Wilks, E. S. Terminology of Polymers Containing Ionizable or Ionic Groups and of Polymers Containing Ions (IUPAC Recommendations 2006). *Pure Appl. Chem.* **2006**, 78 (11), 2067–2074. <https://doi.org/10.1351/pac200678112067>.
- (221) Manning, G. S. Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions I. Colligative Properties. *J. Chem. Phys.* **1969**, 51 (3), 924–933. <https://doi.org/10.1063/1.1672157>.
- (222) Zhu, X.; Tang, F.; Suzuki, T. S.; Sakka, Y. Role of the Initial Degree of Ionization of Polyethylenimine in the Dispersion of Silicon Carbide Nanoparticles. *J. Am. Ceram. Soc.* **2003**, 86 (1), 189–191. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2003.tb03302.x>.
- (223) Galant, C. Nouveaux complexes polyelectrolytes impliquant un polymère de B-cyclodextrine, un tensioactif cationique et un polyanion, Paris XII, 2003.
- (224) Bungenberg de Jong, H. G. Crystallisation-Coacervation-Flocculation. In *Colloid Science*; Elsevier Publishing Co, 1949; Vol. II, Chapter VIII, pp 335–432.

- (225) Fuoss, R. M.; Sadek, H. Mutual Interaction of Polyelectrolytes. *Science* **1949**, *110* (2865), 552–554. <https://doi.org/10.1126/science.110.2865.552>.
- (226) Bakeev, K. N.; Izumrudov, V. A.; Kuchanov, S. I.; Zezin, A. B.; Kabanov, V. A. Kinetics and Mechanism of Interpolyelectrolyte Exchange and Addition Reactions. *Macromolecules* **1992**, *25* (17), 4249–4254. <https://doi.org/10.1021/ma00043a003>.
- (227) Kulkarni, A. D.; Vanjari, Y. H.; Sancheti, K. H.; Patel, H. M.; Belgamwar, V. S.; Surana, S. J.; Pardeshi, C. V. Polyelectrolyte Complexes: Mechanisms, Critical Experimental Aspects, and Applications. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2016**, *44* (7), 1615–1625. <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1129624>.
- (228) Tsuchida, E. Formation of Polyelectrolyte Complexes and Their Structures. *Journal of Macromolecular Science, Part A* **1994**, *31* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1080/10601329409349713>.
- (229) Widom, J.; Baldwin, R. L. Cation-Induced Toroidal Condensation of DNA: Studies with $\text{Co}^{3+}(\text{NH}_3)_6$. *J. Mol. Biol.* **1980**, *144* (4), 431–453. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(80\)90330-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90330-7).
- (230) Mengarelli, V.; Auvray, L.; Pastré, D.; Zeghal, M. Charge Inversion, Condensation and Decondensation of DNA and Polystyrene Sulfonate by Polyethylenimine. *Eur. Phys. J. E.* **2011**, *34* (11), 127. <https://doi.org/10.1140/epje/i2011-11127-3>.
- (231) Ueno, K.; Ueno, H.; Sato, T. Colloidal Polyion Complexation from Sodium Poly(Acrylate) and Poly(Vinyl Ammonium) Chloride in Aqueous Solution. *Polym. J.* **2012**, *44* (1), 59–64. <https://doi.org/10.1038/pj.2011.65>.
- (232) Sæther, H. V.; Holme, H. K.; Maurstad, G.; Smidsrød, O.; Stokke, B. T. Polyelectrolyte Complex Formation Using Alginate and Chitosan. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74* (4), 813–821. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.048>.
- (233) Schatz, C.; Lucas, J.-M.; Viton, C.; Domard, A.; Pichot, C.; Delair, T. Formation and Properties of Positively Charged Colloids Based on Polyelectrolyte Complexes of Biopolymers. *Langmuir* **2004**, *20* (18), 7766–7778. <https://doi.org/10.1021/la049460m>.
- (234) Yue, Y.; Jin, F.; Deng, R.; Cai, J.; Chen, Y.; Lin, M. C. M.; Kung, H.-F.; Wu, C. Revisit Complexation between DNA and Polyethylenimine — Effect of Uncomplexed Chains Free in the Solution Mixture on Gene Transfection. *J. Control. Release* **2011**, *155* (1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.10.028>.
- (235) Kwoh, D. Y.; Coffin, C. C.; Lollo, C. P.; Jovenal, J.; Banaszczyk, 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. *BBA-Gene Struct Expr* **1999**, *1444* (2), 171–190. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00274-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00274-7).
- (236) Mastorakos, P.; Song, E.; Zhang, C.; Berry, S.; Park, H. W.; Kim, Y. E.; Park, J. S.; Lee, S.; Suk, J. S.; Hanes, J. Biodegradable DNA Nanoparticles That Provide Widespread Gene Delivery in the Brain. *Small* **2016**, *12* (5), 678–685. <https://doi.org/10.1002/smll.201502554>.
- (237) Yue, Y.; Pan, X.; Hakim, C. H.; Kodippili, K.; Zhang, K.; Shin, J.-H.; Yang, H. T.; McDonald, T.; Duan, D. Safe and Bodywide Muscle Transduction in Young Adult Duchenne Muscular Dystrophy Dogs with Adeno-Associated Virus. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24* (20), 5880–5890. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv310>.
- (238) Smith, D. E.; Perkins, T. T.; Chu, S. Dynamical Scaling of DNA Diffusion Coefficients. *Macromolecules* **1996**, *29* (4), 1372–1373. <https://doi.org/10.1021/ma951455p>.
- (239) Pandey, A. P.; Sawant, K. K. Polyethylenimine: A Versatile, Multifunctional Non-Viral Vector for Nucleic Acid Delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *68*, 904–918. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.066>.

CHAPITRE 2

Synthèse de copolymères à blocs doubles hydrophiles poly(2-oxazoline-*b*-éthylènimine)[†]

[†]Ce chapitre s'appuie sur un travail publié

Delecourt, G. ; Plet, L. ; Bennevault, V. ; Guégan, P. Synthesis of double hydrophilic block copolymer poly(2-oxazoline-*b*-ethylenimine) in two-step procedure. *ACS Applied Polymer Science*. **2020**, 2, 7, 2696-2705. DOI : 10.1021/acsapm.0c00308

Sommaire

Introduction	107
Partie I. Synthèse des copolymères à blocs poly(2-oxazolines)s	109
I. Synthèse d'homopolymères poly(2-oxazoline)s	110
I.1. Synthèse d'homopolymères poly(2-méthyl-2-oxazoline)s	110
I.1.a. Synthèse de PMeOx de différentes masses molaires	110
I.1.b. Comparaison du chauffage conventionnel et micro-ondes	115
I.2. Synthèse d'homopolymères poly(2-éthyl-2-oxazoline)s	116
I.3. Synthèse d'homopolymères poly(2-isopropyl-2-oxazoline)s	119
II. Synthèse de copolymères poly(2-oxazoline)s	122
II.1. Synthèse des copolymères poly(2-méthyl-2-oxazoline)- <i>b</i> -(2-éthyl-2-oxazoline)s	122
II.2. Synthèse des copolymères poly(2-isopropyl-2-oxazoline)- <i>b</i> -(2-méthyl-2-oxazoline)s	126
Partie II. Synthèse des copolymères à blocs PEI-<i>b</i>-POx	132
I. Hydrolyse des homopolymères	132
I.1. Hydrolyse des homopolymères témoins des PMeOx- <i>b</i> -PEtOx	132
I.2. Hydrolyse des homopolymères PMeOx témoins des PiPrOx- <i>b</i> -PMeOx .	134
II. Hydrolyse des copolymères poly(2-méthyl-2-oxazoline)- <i>b</i> -(2-éthyl-2-oxazoline)s	138
II.1. Thermosensibilité des copolymères PMeOx- <i>b</i> -PEtOx	138
II.2. Hydrolyse basique ou acide des copolymères PMeOx- <i>b</i> -PEtOx	139
III. Hydrolyse des copolymères poly(2-isopropyl-2-oxazoline)- <i>b</i> -(2-méthyl-2-oxazoline)s	143
III.1. Thermosensibilité des copolymères PiPrOx- <i>b</i> -PMeOx	143
III.2. Hydrolyse acide des copolymères PiPrOx- <i>b</i> -PMeOx	143
Conclusion	149
Références	151
Annexes	153

Introduction

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à la synthèse de copolymères à blocs doubles hydrophiles (DHBCs) constitués d'un bloc poly(2-alkyl-2-oxazoline) et d'un bloc polyéthylènimine, potentiels vecteurs non viraux pour le transfert de gènes.

Ces copolymères à blocs sont une alternative envisagée aux copolymères PEG-PEI puisque les poly(2-oxazolines) sont connues pour leur synthèse contrôlée, leur fonctionnalisation aisée et leur biocompatibilité.^{1,2} Ils sont, de plus, les principaux précurseurs des PEI linéaires par hydrolyse acide ou basique.^{3,4}

Différentes stratégies pour la synthèse de ces copolymères d'intérêt sont proposées dans la littérature. Cependant, ces synthèses réalisées par hydrolyse partielle d'homopolymères POx^{5,6} ou hydrolyse préférentielle de copolymères à blocs POx⁷ n'a pas permis, à ce jour, l'obtention de copolymères à blocs doubles hydrophiles POx-*b*-PEI bien définis. La synthèse de POx-*b*-PEI a également été réalisée par couplage de deux chaînes polymère, POx d'une part et PEI d'autre part, mais nécessite alors des étapes de purification fastidieuses avec de faibles rendements.⁸

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous proposons de développer une méthode de synthèse de POx-*b*-PEI par hydrolyse sélective de copolymères à blocs poly(2-oxazoline)s. La stratégie développée repose sur l'auto-organisation des macromolécules en solution sous forme de micelles avant l'étape d'hydrolyse (**Schéma II.1**).

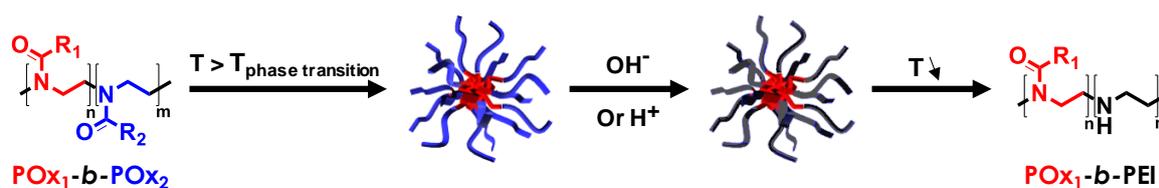


Schéma II.1 : Synthèse de DHBCs POx-*b*-PEI par hydrolyse sélective de copolymères POx₁-*b*-POx₂.

Dans une première partie, différents copolymères poly(2-oxazoline)s avec un bloc présentant une température de transition de phase supérieure à la température corporelle humaine seront tout d'abord synthétisés. Les synthèses de poly(2-méthyl-2-oxazoline)-*b*-poly(2-éthyl-2-oxazoline)s (PMeOx-*b*-PEtOx) et de poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-*b*-poly(2-méthyl-2-oxazoline)s (PiPrOx-*b*-PMeOx) seront ainsi présentées. Puis, dans une seconde partie, les hydrolyses acide et basique de ces copolymères seront étudiées. Les réactions d'hydrolyse seront réalisées au-dessus de la température de transition de phase des copolymères

Chapitre 2

dans le but d'obtenir une micelle composée d'un cœur PEtOx ou PiPrOx et d'une couronne PMeOx. La protection attendue des blocs PEtOx et PiPrOx par le cœur collapsé non accessible devrait permettre d'obtenir une hydrolyse sélective et totale des blocs PMeOx à haute température, et donc de synthétiser les DHBCs POx-*b*-PEI souhaités.

Partie I. Synthèse des copolymères à blocs poly(2-oxazolines)s

Nous souhaitons synthétiser des copolymères $PO_{x1}-b-PO_{x2}$ de structure contrôlée par polymérisation cationique par ouverture de cycle. Pour choisir les monomères de chaque bloc, l'étape d'hydrolyse ainsi que l'application visée doivent être prise en compte : un bloc hydrophile sera hydrolysé pour former le bloc PEI alors qu'un second bloc doit posséder une LCST (« lower critical solution temperature ») afin de garantir la formation de micelles comme expliqué précédemment. Cependant, afin d'obtenir, après hydrolyse, des polymères à blocs PEI-*b*-POx doubles hydrophiles à la température du corps humain, il est nécessaire d'utiliser un bloc POx présentant une LCST supérieure à la température corporelle. D'après la **Figure II.1**, deux monomères peuvent être utilisés en combinaison avec la MeOx : la 2-éthyl-2-oxazoline et la 2-isopropyl-2-oxazoline. C'est pourquoi des copolymères poly(2-méthyl-2-oxazoline)-*b*-poly(2-éthyl-2-oxazoline) (PMeOx-*b*-PEtOx) et poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-*b*-poly(2-méthyl-2-oxazoline) (PiPrOx-*b*-PMeOx) seront synthétisés.

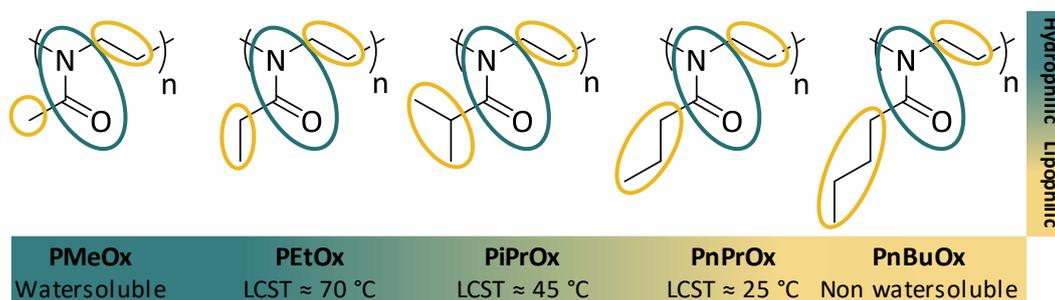


Figure II.1 : LCST de différents poly(2-alkyl-2-oxzoline)s dans l'eau.

Au préalable, l'homopolymérisation des différentes 2-oxazolines sélectionnées a été étudiée dans le but d'optimiser les conditions de polymérisation. Cette étude est nécessaire afin de déterminer les conditions de réaction permettant une conversion totale des monomères et un bon contrôle de la polymérisation.

I. Synthèse d'homopolymères poly(2-oxazoline)s

I.1. Synthèse d'homopolymères poly(2-méthyl-2-oxazoline)s

I.1.a. Synthèse de PMeOx de différentes masses molaires

Différents homopolymères PMeOx ont été synthétisés en vue d'obtenir une bibliothèque de polymères de différentes masses molaires. Ces polymères serviront de témoins pour les blocs PMeOx des copolymères qui seront synthétisés par la suite.

La polymérisation de la MeOx a été étudiée dans les conditions habituelles⁹ : dans l'acétonitrile à 80 °C, par chauffage conventionnel, en utilisant deux amorceurs insaturés, le bromure d'allyle et le *p*-toluènesulfonate de propargyle. Nous montrerons plus tard que l'extrémité insaturée des chaînes polymère, issue du bromure d'allyle, est sensible aux conditions d'hydrolyse, ce qui nous a contraints à changer d'amorceur en cours d'étude. Les polymères synthétisés ont des degrés de polymérisation (X_n) variant de 35 à 352 et sont terminés par de la pipéridine, de la 1-(2-propynyl)pipérazine ou de la morpholine (**Schéma II.2**). Ces différentes terminaisons de chaînes modifient la solubilité des polymères ou peuvent permettre des post-fonctionnalisations notamment dans le cas de la 1-(2-propynyl)pipérazine. Le **Tableau II.1** répertorie les différents polymères synthétisés, les conditions opératoires ainsi que quelques analyses structurales effectuées.

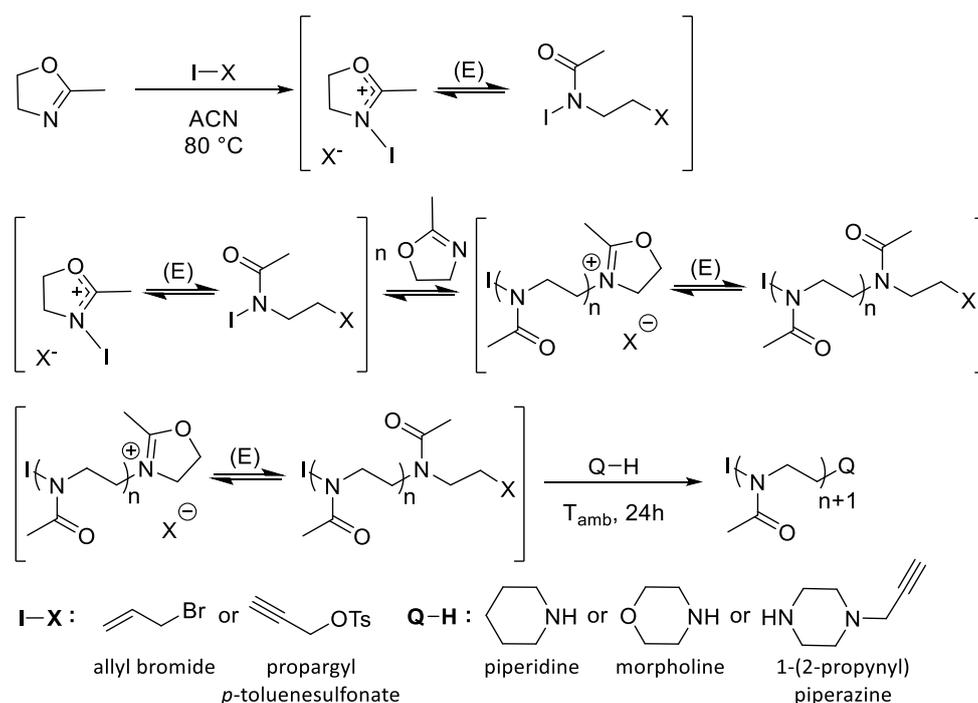


Schéma II.2 : Synthèse des PMeOx et structures des amorceurs et agents de terminaison utilisés.

Tableau II.1 : Synthèse de PMeOx témoins.

Run	Initiator & quench used	MeOx/I/Q	Time ¹ (days)	<i>p</i> ² %	<i>M_n</i> ³ kg.mol ⁻¹ (th)	<i>M_n</i> ⁴ kg.mol ⁻¹ (NMR)	<i>M_n</i> ⁵ kg.mol ⁻¹ (SEC)	<i>D</i> ⁵	<i>f</i> ⁶ %
GwD-04*	Allyl bromide	35/1/5	1	100	3.0	3.2	2.9	1.25	75
GwD-14*	and piperidine	234/1/10	4	98	19.6	19.5	17.6	1.50	100
GwD-63*	Allyl bromide and 1-(2-propynyl) piperazine	35/1/10	1	99.8	3.0	4.0	3.9	1.16	0
GwD-134#	Propargyl	118/1/10	3	100	10.0	9.6	8.8	1.30	100
GwD-133#	<i>p</i> -toluene sulfonate and	235/1/10	4	100	20.0	18.5	16.9	1.54	100
GwD-84#	morpholine	352/1/10	7	99.4	29.8	21.2	21.5	1.63	100

I and Q correspond respectively to the initiator and quencher

[MeOx] = 1.5 M in ACN

* Dialysis against water

One dialysis against ACN and second dialysis against water

¹ : polymerization time

² : MeOx conversion determined by ¹H NMR

³ : $M_n(\text{th}) = ([\text{MeOx}] \times M(\text{MeOx}) \times \text{Conversion}) / [\text{I}]$

⁴ : determined by ¹H NMR

⁵ : SEC in DMF; PMMA standards

⁶ : Polymer functionalization by the quencher

L'analyse par RMN ¹H du milieu réactionnel après désactivation des centres actifs permet de déterminer le taux de conversion en monomère. La conversion est déterminée par comparaison des signaux des protons méthylène du monomère résiduel dans la zone 3,6-4,0 ppm et des protons méthylène du squelette du polymère à 3,42 ppm. Les différentes synthèses présentent toutes des taux de conversion, *p*, très proches de 100 %. Ce taux de conversion est ensuite utilisé dans le calcul de la masse molaire moyenne en nombre théorique du polymère (*M_n*_{th}).

Après purification du polymère par dialyse, l'analyse du spectre RMN ¹H permet de calculer la masse molaire moyenne en nombre du polymère, notée *M_n*_{RMN}. La **Figure II.2** présente, à titre d'exemple, le spectre RMN ¹H du polymère purifié GwD-04. Dans le cas du bromure d'allyle, soit pour les polymères GwD-04 et GwD-14, les protons allyliques issus de l'amorceur (protons 1 et 2) observés entre 5,0 et 6,0 ppm et les protons du motif de répétition situés à 3,42 ppm pour les protons méthylène du squelette du polymère (protons 4 et 5) et à 2,07 ppm pour les protons méthyle des groupements latéraux (protons 7) sont utilisés pour réaliser ce calcul. Dans le cas du *p*-toluènesulfonate de propargyle, les protons méthyne des extrémités de chaîne qui résonnent entre 4,2 et 4,4 ppm sont pris comme référence (protons 3). Les masses molaires obtenues par RMN, comprises entre 3,2 et 21.2 kg.mol⁻¹, sont en accord avec les

valeurs théoriques. Néanmoins, l'intégrale du signal corrélé aux protons 3 est parfois impactée par le signal voisin correspondant aux protons méthylène des unités MeOx. Cela explique la différence entre certaines valeurs théoriques et RMN en particulier pour GwD-84.

La fonctionnalisation des fins de chaîne par l'agent de terminaison peut également être évaluée. Pour cela, les intégrales des protons 8, 9 et 10 dont les signaux se trouvent respectivement à 2,45 ppm, 1,55 ppm et 1,45 ppm sont comparées aux intégrales des protons 1 et 2. Pour GwD-04, la désactivation des centres actifs a été réalisée en introduisant dans le milieu réactionnel 5 équivalents de pipéridine/amorceur et en laissant le système sous agitation pendant 15 heures. En calibrant le signal des protons 2 à 1,00, les valeurs des protons 9 et 10 sont exactement de 3,0 et 1,6. La fonctionnalisation des fins de chaîne n'est donc que partielle (75 %). Pour les autres polymérisations, 10 équivalents d'agent de terminaison ont été utilisés, une fonctionnalisation totale des fins de chaîne polymère est alors observée.

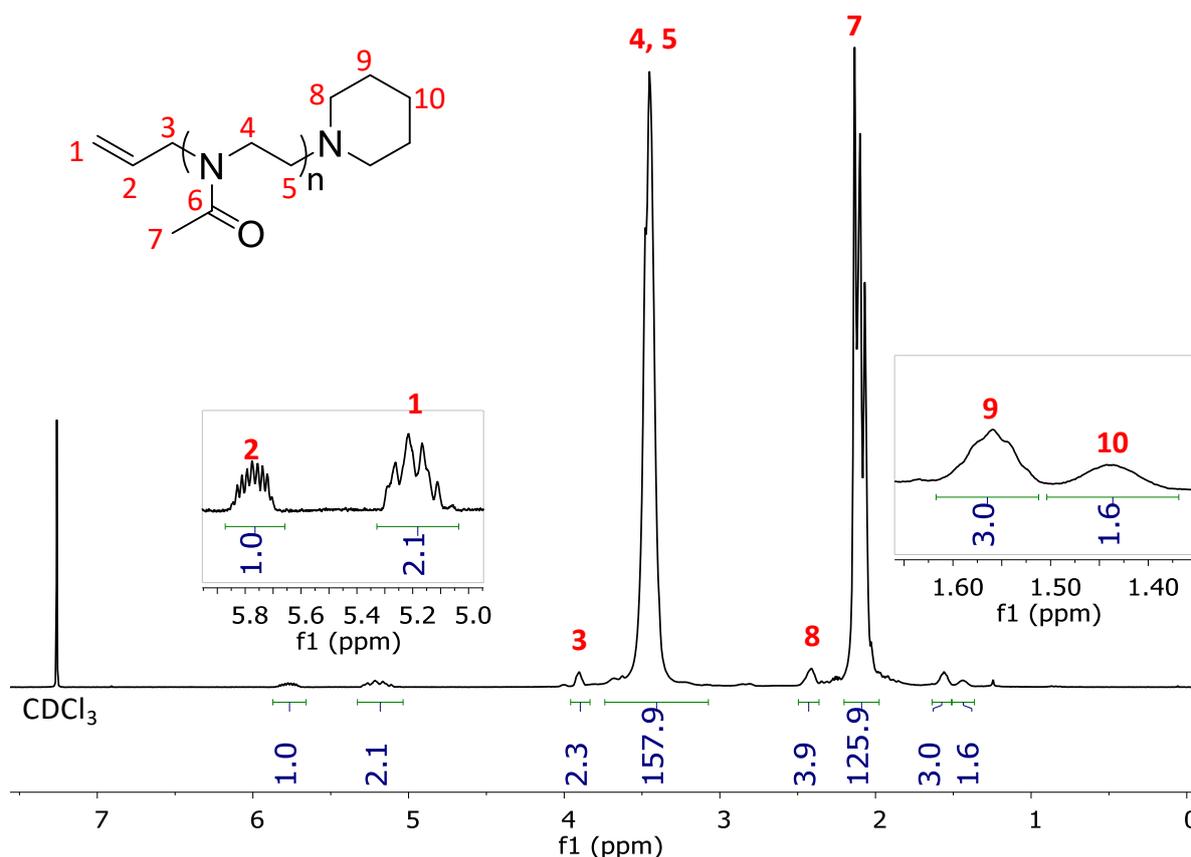


Figure II.2 : Spectre RMN ^1H du polymère GwD-04 dans du CDCl_3 à 20 °C.

Les polymères ont, également, été caractérisés par chromatographie d'exclusion stérique (CES) dans le diméthylformamide (DMF) équipée d'un détecteur à indice de réfraction (RI). Les chromatogrammes des polymères sont présentés à la **Figure II.3.a**. Les masses molaires ($M_{n\text{ SEC}}$) sont données après purification et sont proches des valeurs attendues pour les

faibles masses molaires (GwD-04, GwD-63 et GwD-134). Cependant, à haute masse molaire (GwD-14, GwD-133 et GwD-84), les valeurs obtenues par CES (entre 16,9 et 21,5 kg.mol⁻¹) s'éloignent des valeurs théoriques (entre 19,6 et 29,8 kg.mol⁻¹). En effet, une adsorption des chaînes PMeOx est suspectée sur les colonnes chromatographiques comme en témoigne la traînée sur les chromatogrammes des polymères GwD-14, GwD-133 et GwD-84. Des résultats similaires ont déjà été observés dans des travaux antérieurs.¹⁰ Néanmoins, afin de confirmer cette hypothèse, le polymère GwD-14 a été analysé par CES aqueuse équipée d'une triple détection (détecteurs à indice de réfraction (RI), de diffusion de la lumière (LS) et viscosimétrique) (**Figure II.3.b**). La masse molaire obtenue par cette analyse est de 20,8 kg.mol⁻¹ avec une dispersité de 1,19 et est en accord avec les valeurs théorique et RMN. De plus, le chromatogramme obtenu est plus symétrique confirmant ainsi notre hypothèse.

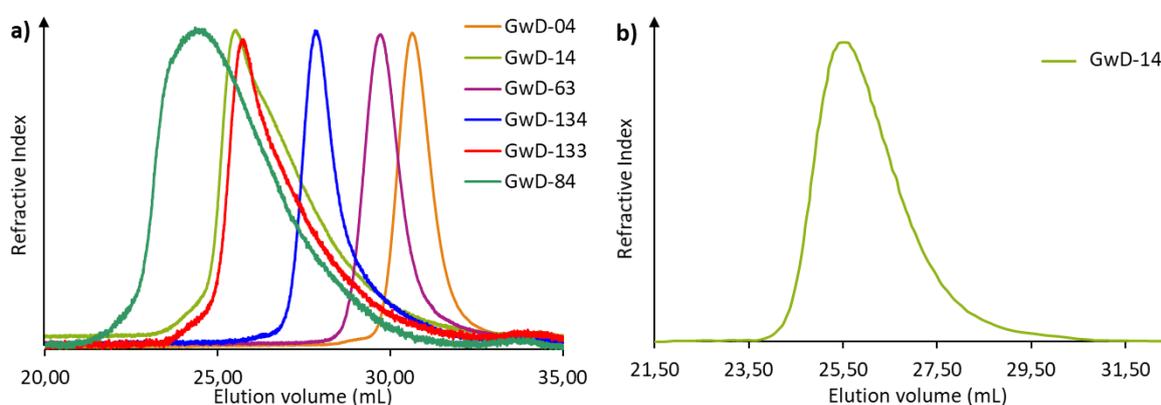
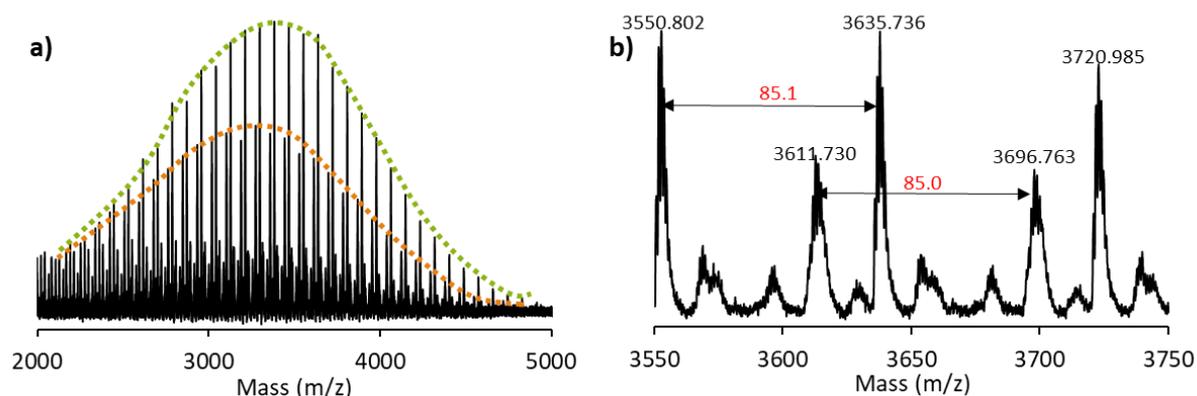


Figure II.3 : Chromatogrammes (a) par CES DMF des polymères PMeOx et (b) par CES aqueuse du polymère GwD-14.

D'autre part, une analyse MALDI-TOF a été effectuée sur le polymère GwD-04 afin de confirmer la structure du polymère (**Figure II.4**). La population principale correspond à la structure attendue : le polymère amorcé par le bromure d'allyle, terminé par la pipéridine et cationisé avec Na⁺. Néanmoins, des réactions secondaires sont mentionnées par des populations supplémentaires. Une des populations est notamment issue d'une réaction de transfert et possède un proton et un résidu pipéridine comme extrémités de chaîne. Ces populations sont néanmoins minoritaires puisque les analyses CES donnent des masses molaires proches des valeurs théoriques.



X_n	40	41
Calculated exact mass	3550.802	3611.500
Structural formula		

Figure II.4 : (a) Spectre MALDI-TOF du polymère GwD-04 en mode réflectron et (b) zoom sur la zone 3550 – 3750 m/z.

De plus, nous pouvons comparer les polymères GwD-14 et GwD-133 qui ont la même masse molaire visée. Le premier est amorcé par du bromure d'allyle et terminé par de la pipéridine, le deuxième est, quant à lui, amorcé par du *p*-toluènesulfonate de propargyle et terminé par de la morpholine. Les résultats obtenus pour ces deux polymères sont très similaires en ce qui concerne la conversion en monomère et les masses molaires obtenues par RMN et CES. Ainsi, le changement d'amorceur n'a pas d'influence sur la polymérisation de la MeOx.

Pour terminer, une étude a été réalisée avec différents agents de terminaison portant une amine secondaire : la pipéridine, la morpholine et la 1-(2-propynyl)pipérazine. Les deux premiers agents de terminaison permettent une fonctionnalisation totale des fins de chaîne. La morpholine améliore la solubilité des polymères dans l'eau grâce à l'atome d'oxygène. La 1-(2-propynyl)pipérazine, quant à elle, ne permet pas une terminaison efficace. En effet, aucun résidu issu de la 1-(2-propynyl)pipérazine n'est observé sur les spectres RMN ^1H des polymères purifiés, suggérant l'absence de fonctionnalisation. Cela peut être expliqué par l'aspect pâteux du produit suggérant la présence d'eau, malgré les précautions prises (manipulation en boîte à gant et séchage à la rampe à vide avant utilisation), qui entraîne une réaction de terminaison secondaire. Ainsi, afin d'introduire une fonction alcyne sur la chaîne polymère, l'amorçage de la polymérisation par le *p*-toluènesulfonate de propargyle sera la stratégie utilisée.

I.1.b. Comparaison du chauffage conventionnel et micro-ondes

Les temps de polymérisation observés pour les synthèses précédentes étant longs, notamment pour les hautes masses molaires (7 jours), la polymérisation par micro-ondes a été étudiée dans le but d'accélérer la réaction. Ce mode de synthèse pour la polymérisation des oxazolines est largement utilisé dans la littérature et permet de réduire fortement les temps de réaction.¹¹ Ainsi, des polymérisations ont été réalisées, soit par chauffage conventionnel, soit par micro-ondes dans le but de comparer ces deux voies de synthèse. Les polymères ont été amorcés par du bromure d'allyle ou le *p*-toluènesulfonate de propargyle et terminés par de la pipéridine ou de la morpholine. Deux concentrations en monomère ont été testées : 1,5 M et 4 M. Les conditions de synthèse et les résultats obtenus après purification des polymères sont présentés dans le **Tableau II.2**.

Tableau II.2 : Synthèse de PMeOx par chauffage conventionnel ou par micro-ondes.

Run	Method	MeOx/I/Q	Time ¹	[MeOx] mol.L ⁻¹	<i>p</i> ² %	<i>M_n</i> ³ kg.mol ⁻¹ (th)	<i>M_n</i> ⁴ kg.mol ⁻¹ (NMR)	<i>M_n</i> ⁵ kg.mol ⁻¹ (SEC)	<i>D</i> ⁵
GwD-25*		350/1/10	96 h	4	30	-	-	-	-
GwD-14*	Conventional 80 °C	234/1/10	4 d	1.5	98	19.6	19.5	17.6	1.50
GwD-84#		352/1/10	7 d	1.5	99.4	29.8	30.1	21.5	1.63
GwD-10*	Micro-Waves 140 °C	354/1/5	40 min	4	95	28.5	25.3	12.7	1.90
GwD-11*		354/1/5	2 h	1.5	80	24.0	22.7	5.5	1.80

I and Q correspond respectively to the initiator (allyle bromide) and quencher (piperidine); solvent: ACN

Dialysis performed in water

¹ : polymerization time

² : MeOx conversion determined by ¹H NMR

³ : $M_n(\text{th}) = ([\text{MeOx}] \times M(\text{MeOx}) \times \text{Conversion}) / [\text{I}]$

⁴ : determined by ¹H NMR

⁵ : SEC in DMF; PMMA standards

* : initiated by allyl bromide and quenched by piperidine

: initiated by propargyl *p*-toluenesulfonate and quenched by morpholine

Dans le cas des polymérisations par micro-ondes, 40 min à 2 h de réaction suffisent pour atteindre des conversions en monomère élevées, respectivement 95 % et 80 % (GwD-10 et 11) lorsque la concentration en monomère est respectivement de 4 M ou de 1,5 M. A haute concentration, la polymérisation n'a pu être menée à terme par chauffage conventionnel, suite à une précipitation du milieu réactionnel aux alentours de 110 h de réaction (GwD-25). Aucune analyse n'a donc été effectuée sur ce polymère. La conversion indiquée dans le tableau correspond à un prélèvement du milieu réactionnel effectué au bout de 96 h (la faible conversion obtenue n'a pas permis d'effectuer de caractérisations).

Les analyses CES des polymères purifiés GwD-10 et GwD-11 mettent en évidence des masses molaires ($12,7$ et $5,5 \text{ kg.mol}^{-1}$) nettement inférieures aux valeurs théoriques ($28,5$ et $24,0 \text{ kg.mol}^{-1}$) et RMN ($25,3$ et $22,7 \text{ kg.mol}^{-1}$). Nous avons évoqué précédemment une absorption des polymères de fortes masses molaires sur les colonnes chromatographiques, induisant un écart entre la $M_{n \text{ SEC}}$ et les valeurs RMN et théoriques. Cependant, cet écart est ici beaucoup plus prononcé. De plus, les dispersités obtenues, respectivement $1,90$ et $1,80$ pour les polymères GwD-10 et GwD-11, sont plus élevées que celles obtenues par chauffage conventionnel ($1,50$ et $1,63$ respectivement pour GwD-14 et GwD-84). Ces résultats témoignent d'une augmentation des réactions secondaires au cours de la polymérisation.

Pour conclure, malgré le bénéfice des micro-ondes pour réduire significativement les temps de polymérisation, la synthèse par voie conventionnelle à une concentration de $1,5 \text{ M}$ en monomère sera préférée pour réaliser les prochaines polymérisations.

I.2. Synthèse d'homopolymères poly(2-éthyl-2-oxazoline)s

De la même manière, des homopolymères poly(2-éthyl-2-oxazoline)s ont été synthétisés dans le but de déterminer des conditions de synthèse permettant une polymérisation contrôlée et totale de la 2-éthyl-2-oxazoline. Pour cela, des PEtOx de 2 à 9 kg.mol^{-1} amorcées par du bromure d'allyle et terminées par de la pipéridine ont été synthétisées avec une concentration en monomère variable, correspondant à celles utilisées dans les futures copolymérisations. Les conditions de synthèse et les analyses effectuées (après purification) sont répertoriées dans le **Tableau II.3**.

Tableau II.3 : Synthèse de PEtOx témoins.

Run	EtOx/I/Q	Time ¹ days	[EtOx] mol.L ⁻¹	p ² %	M _n ³ kg.mol ⁻¹ (th)	M _n ⁴ kg.mol ⁻¹ (NMR)	M _n ⁵ kg.mol ⁻¹ (SEC)	D ⁵	f ⁶ %
GwD-08	91/1/5	2	2.8	99	8.9	8.5	9.9	1.15	97.5
GwD-15	31/1/10	1	0.2	70	2.1	1.9	1.7	1.30	100
GwD-47	31/1/10	3	0.2	92.6	2.8	3.2	3.3	1.19	94.5
GwD-49	51/1/10	4	0.3	97.2	4.9	5.7	6.5	1.10	100

I and Q correspond respectively to the initiator (allyl bromide) and quencher (piperidine); solvent: ACN

Dialysis performed in water

¹ : polymerization time

² : MeOx conversion determined by ¹H NMR

⁶ : End chain functionality

³ : $M_n(\text{th}) = ([\text{EtOx}] \times M(\text{EtOx}) \times \text{conversion}) / [\text{I}]$

⁴ : determined by ¹H NMR

⁵ : SEC in DMF; PMMA standards

L'analyse du milieu réactionnel par RMN ^1H a permis, comme précédemment, de déterminer la conversion en monomère à la fin de la polymérisation et la masse molaire théorique du polymère ($M_{n\text{ th}}$). Les polymères sont ensuite purifiés en effectuant une dialyse contre l'eau. Le spectre RMN ^1H de la PEtOx GwD-49 purifiée est présenté en **Figure II.5**. Les protons méthylène du squelette du polymère (protons 4 et 5) présentent un signal à 3,42 ppm, les protons du substituant éthyle des unités de répétition résonnent à 1,0 ppm pour les protons méthyle (protons 8) et dans la zone 2,1-2,4 ppm pour les protons méthylène (protons 7). Les signaux se trouvant à 5,1 et 5,7 ppm correspondent respectivement aux protons insaturés 1 et 2 de l'extrémité de chaîne polymère. Ces différents signaux ont été utilisés pour calculer la masse molaire des polymères ($M_{n\text{ RMN}}$).

Des ajustements des temps de réaction ont été nécessaires, notamment pour les homopolymères GwD-15 et GwD-47. La faible concentration en monomère ($[\text{EtOx}] = 0,2 \text{ mol.l}^{-1}$) utilisée dans ces expériences nous a conduits à augmenter le temps de polymérisation afin de s'approcher d'une conversion totale. Ainsi, 24 h ne se sont pas montrées suffisantes, puisque seulement 70 % du monomère a été polymérisé après ce laps de temps. Il faudra réaliser la polymérisation pendant 3 jours afin d'obtenir une conversion supérieure à 90 %.

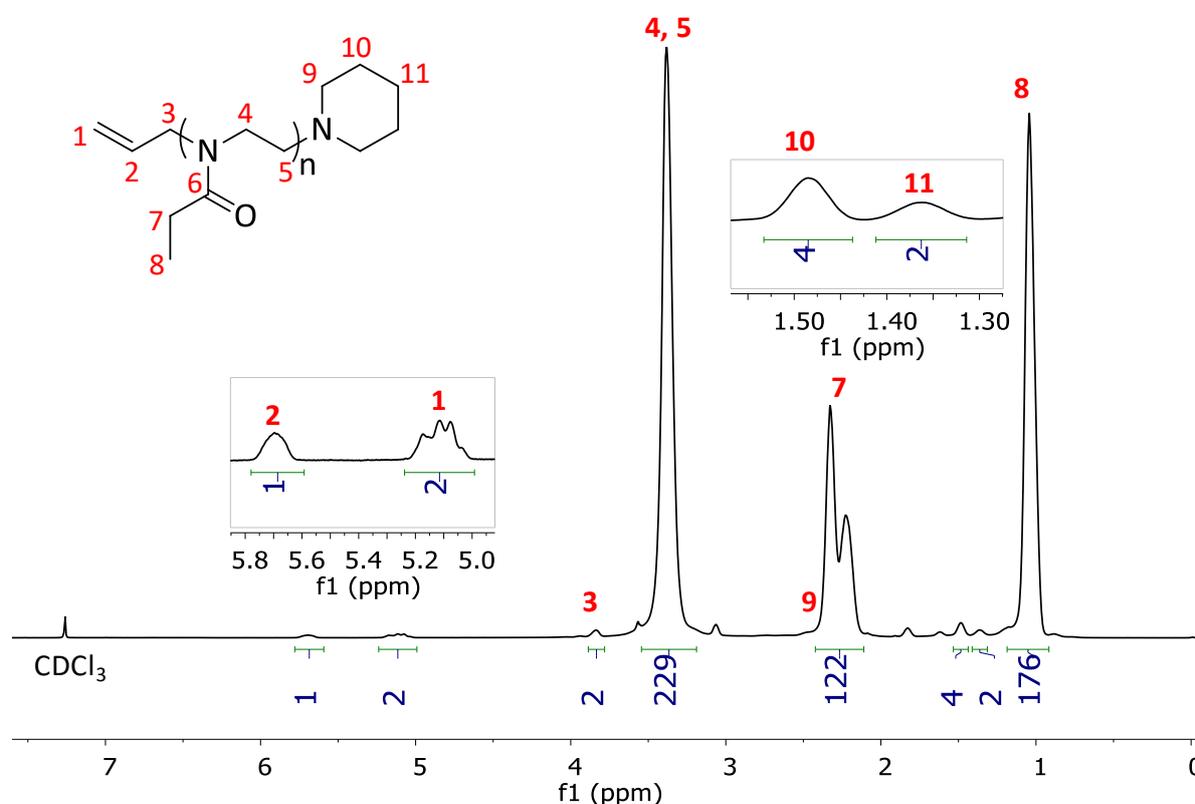
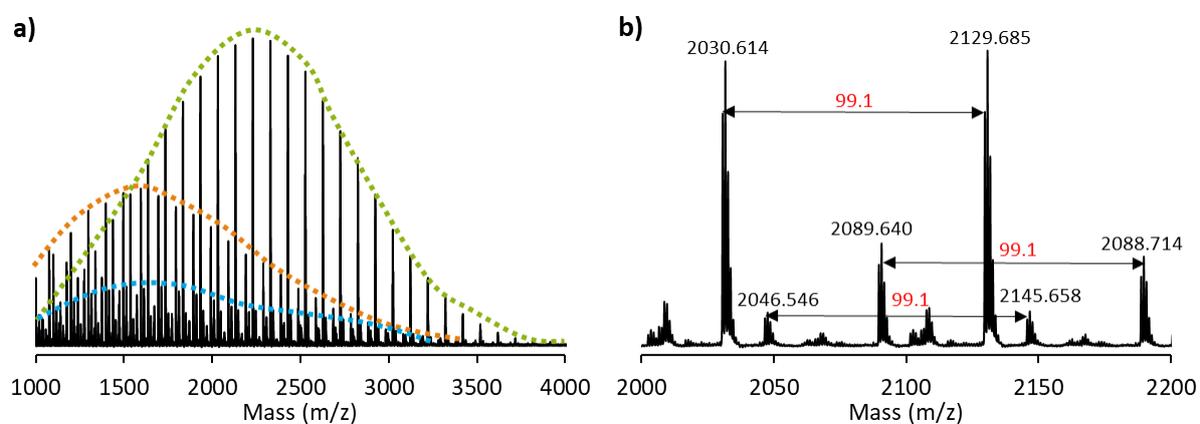


Figure II.5 : Spectre RMN ^1H du polymère GwD-49 dans du CDCl_3 à 20 °C.

Les chromatogrammes CES DMF des polymères purifiés montrent des signaux monomodaux avec des dispersités faibles (1,10 à 1,30) et conduisent à des masses molaires en accord avec les valeurs obtenues par RMN et les valeurs théoriques. Néanmoins, nous noterons que lorsque la masse molaire augmente, un plus grand écart est observé entre les masses molaires CES et les masses molaires théoriques ou RMN. Cet écart est sûrement dû à la calibration utilisée, qui est une calibration PMMA.

Une analyse MALDI-TOF a été effectuée sur le polymère GwD-15 afin de confirmer la structure du polymère (**Figure II.6**). La population principale correspond à la structure attendue : polymère amorcé par le bromure d'allyle, terminé par la pipéridine et cationisé avec Na^+ . Néanmoins, des populations mineures apparaissent indiquant la présence de réactions secondaires. Une des populations est notamment issue de réactions de transfert et possède, ainsi, un proton et un résidu pipéridine comme extrémités de chaîne. Ces populations sont néanmoins minoritaires puisque les analyses CES donnent des masses molaires proches des valeurs théoriques. Il est à noter que seules les macromolécules possédant une fin de chaîne pipéridine sont identifiées sur le spectre, ce qui laisse supposer que la présence d'amine tertiaire sur les macromolécules favorise la désorption.



X_n	19	20	19
Calculated exact mass	2030.409	2089.609	2046.383
Structural formula			

Figure II.6 : (a) Spectre MALDI-TOF du polymère GwD-15 en mode réflectron et (b) zoom sur la zone 2000 – 2200 m/z.

I.3. Synthèse d'homopolymères poly(2-isopropyl-2-oxazoline)s

Les derniers homopolymères témoins que nous avons étudiés en vue de synthétiser les copolymères sont les homopolymères PiPrOx. Ces polymères sont synthétisés également dans l'ACN, amorcés par du *p*-toluènesulfonate de propargyle et terminés par de la pipéridine (GwD-67 et 72) ou de la morpholine (GwD-110). Ils ont une masse molaire visée de 5,7 kg.mol⁻¹. Le **Tableau II.4** récapitule les conditions de polymérisation et les résultats des analyses des polymères après purification.

Tableau II.4 : Synthèse de PiPrOx témoins.

Run	iPrOx/I/ Q	Time ¹ days	T °C	[iPrOx] mol.L ⁻¹	p ² %	M _n ³ kg.mol ⁻¹ (th)	M _n ⁴ kg.mol ⁻¹ (NMR)	M _n ⁵ kg.mol ⁻¹ (SEC)	D ⁵
GwD-67	51/1/10	10	42	1.5	89	5.1	5.6	7.0	1.07
GwD-72	51/1/10	2	80	1.5	99	5.6	5.7	7.5	1.06
GwD-110*	51/1/10	2.7	80	1.5	100	5.7	5.5	7.4	1.06

I and Q correspond respectively to the initiator (propargyl *p*-toluenesulfonate) and quencher (piperidine)
[iPrOx] = 1.5 M in ACN, first dialysis performed in ACN and second dialysis in water

* Quenched by morpholine

¹ : polymerization time

² : MeOx conversion determined by ¹H NMR

³ : M_n(th) = ([iPrOx] × M(iPrOx) × conversion) / [I]

⁴ : determined by ¹H NMR

⁵ : SEC in DMF ; PMMA standards

Le milieu réactionnel final puis les polymères purifiés ont été analysés par RMN ¹H afin de déterminer successivement la conversion en monomère, la masse molaire théorique et la masse molaire RMN. La **Figure II.7** présente le spectre RMN ¹H du polymère GwD-72 purifié. La conversion est calculée en utilisant les protons méthylène du monomère résiduel dans la zone 3,7 – 4,0 ppm et les protons méthylène du squelette du polymère à 3,42 ppm. Pour calculer la masse molaire du polymère, les protons méthylène de l'extrémité générée lors de l'amorçage (protons 3), qui résonnent dans la zone 4,2-4,4 ppm, sont utilisés ainsi que les protons méthylène du squelette du polymère à 3,5 ppm (protons 4 et 5). Les protons méthyle du groupe pendant des unités monomère (protons 8) résonnent, quant à eux, à 1,1 ppm et les protons méthine (protons 7) vers 2,7-3,1 ppm. Concernant les protons 7, un double signal est obtenu dû à la restriction de rotation démontrée par Winnik.¹²

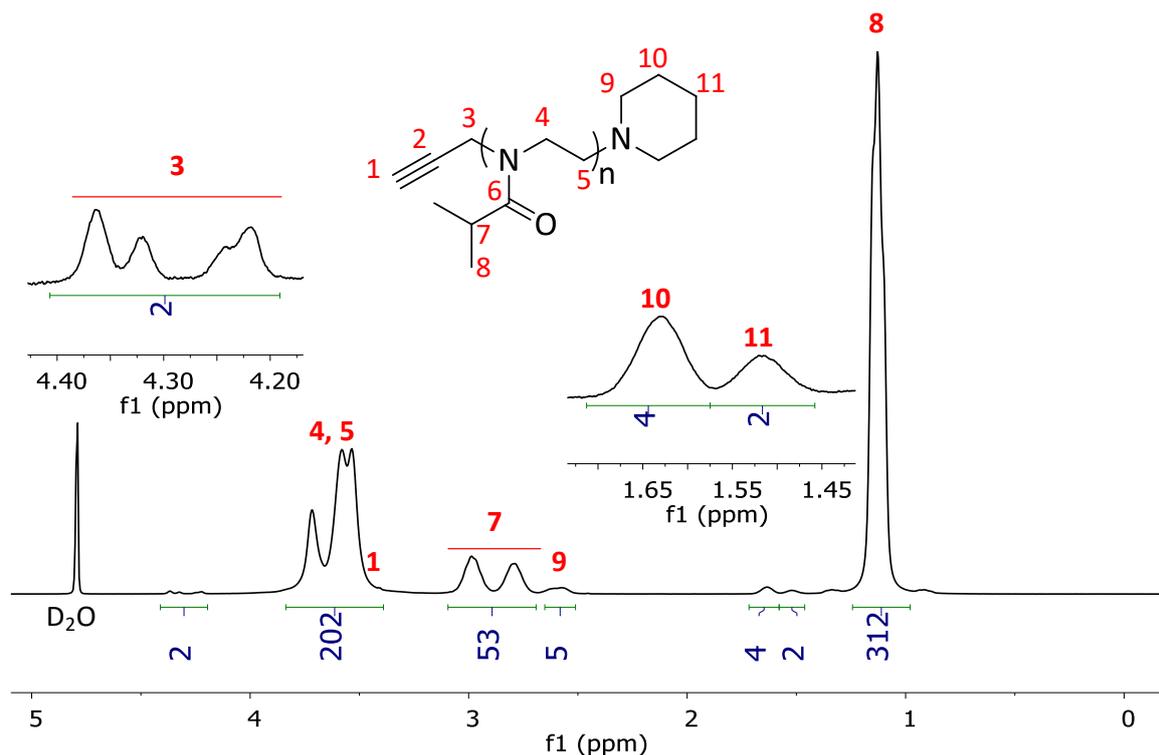


Figure II.7 : Spectre RMN ^1H du polymère GwD-72 purifié dans du D_2O à 20 °C.

Des réactions de couplage et de transfert au cours de la polymérisation de la 2-isopropyl-2-oxazoline réalisée à 85 °C ou à 60 °C sont reportées par Park et Kataoka.¹³ Ils réalisent alors cette polymérisation à 42 °C afin de contrôler les réactions secondaires. Au vu de leurs résultats, nous avons réalisé la synthèse de GwD-67 à 42 °C. La conversion est de 89 % après 10 jours de polymérisation avec des masses molaires théorique et RMN en accord. L'analyse par CES DMF montre un signal monomodal très étroit et la masse molaire obtenue est légèrement plus élevée que les valeurs précédentes, probablement due à l'utilisation d'une calibration PMMA (**Figure II.8**). Ces résultats semblent confirmer l'absence de réactions secondaires.

Cependant, cette polymérisation étant très longue (10 jours), la même polymérisation a été effectuée à la température habituelle (80 °C) afin de vérifier si le contrôle de la polymérisation pouvait tout de même être conservé dans nos conditions contrairement à l'étude de Park. Ainsi, la synthèse GwD-72 réalisée à 80 °C dans les mêmes conditions a nécessité 48 h de polymérisation pour obtenir une conversion totale (soit 5 fois moins de temps que GwD-67 à 42 °C). La masse molaire calculée par RMN ^1H est en accord avec la valeur théorique. En ce qui concerne l'analyse par CES DMF, une unique population est observée avec une masse molaire plus élevée qu'attendue comme observée pour GwD-67. Une dispersité faible est conservée (**Figure II.8**).

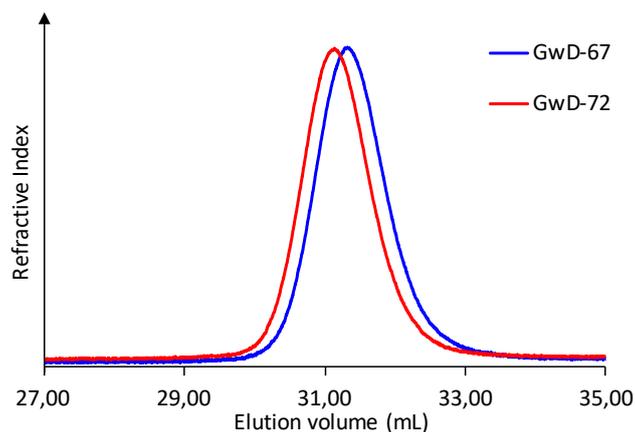
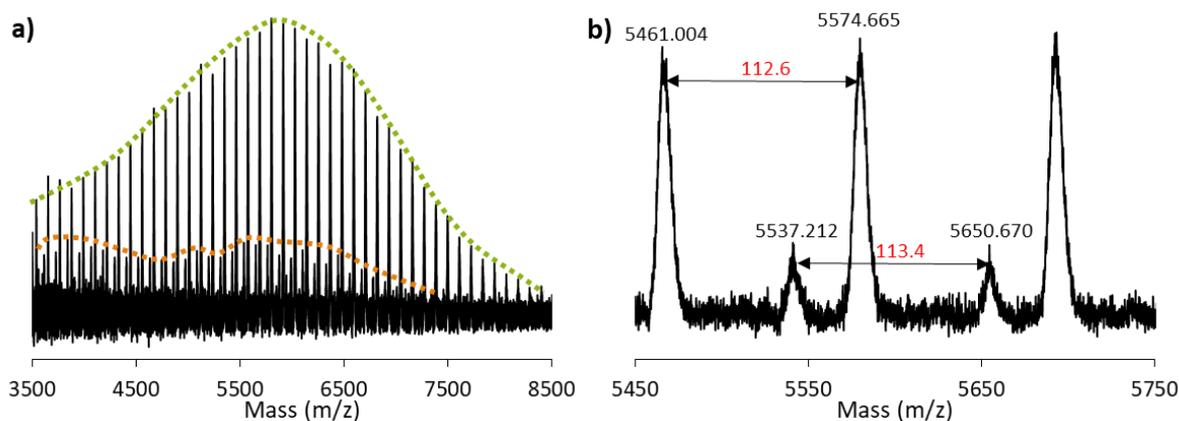


Figure II.8 : Chromatogrammes des polymères GwD-67 et GwD-72 par CES DMF.

De plus, le polymère GwD-72 a été analysé par MALDI-TOF afin de confirmer sa structure. Comme le montre la **Figure II.9**, une population majoritaire est obtenue et correspond au polymère amorcé par le *p*-toluènesulfonate de propargyle, terminé par la pipéridine et cationisé par Na^+ . Une deuxième population minoritaire n'a cependant pas pu être identifiée. Le contrôle de la polymérisation est conservé en réalisant la polymérisation à 80 °C puisque les masses molaires RMN, SEC et l'analyse MALDI-TOF sont en accord avec la théorie. Nous pouvons donc polymériser l'iPrOx à 80 °C dans nos conditions.



X_n	47
Calculated exact mass	5461.0421
Structural formula	

Figure II.9 : (a) Spectre MALDI-TOF du polymère GwD-72 en mode réflectron et (b) zoom sur la zone 5450 – 5750 m/z.

Pour conclure, les synthèses de ces différents homopolymères ont permis de mettre au point les conditions expérimentales permettant un contrôle de la polymérisation et une conversion totale des monomères. Les analyses ont montré que ces polymérisations permettent la synthèse de polymères ayant la structure souhaitée pour les trois monomères utilisés (MeOx, EtOx et iPrOx).

II. Synthèse de copolymères poly(2-oxazoline)s

Grâce aux conditions de synthèse déterminées précédemment, la synthèse de deux types de copolymères a pu être réalisée. Ces copolymères sont composés d'un bloc PMeOx, et d'un bloc PEtOx ou PiPrOx.

II.1. Synthèse des copolymères poly(2-méthyl-2-oxazoline)-*b*-(2-éthyl-2-oxazoline)s

Des copolymères PMeOx-*b*-PEtOx avec différents ratios MeOx/EtOx ont été synthétisés en amorçant la polymérisation avec du bromure d'allyle et en introduisant séquentiellement les monomères 2-méthyl-2-oxazoline et 2-éthyl-2-oxazoline dans le milieu réactionnel selon le **Schéma II.3**. Ces synthèses sont réalisées dans les conditions habituelles, soit dans l'acétonitrile à 80°C (chauffage conventionnel) et le ratio MeOx/EtOx est modulé par la quantité d'EtOx ajoutée au milieu réactionnel. Les conditions de polymérisation ainsi que les masses molaires des polymères obtenus après purification sont résumées dans le **Tableau II.5** (Les polymères de ce tableau portent la numérotation utilisée dans la publication).

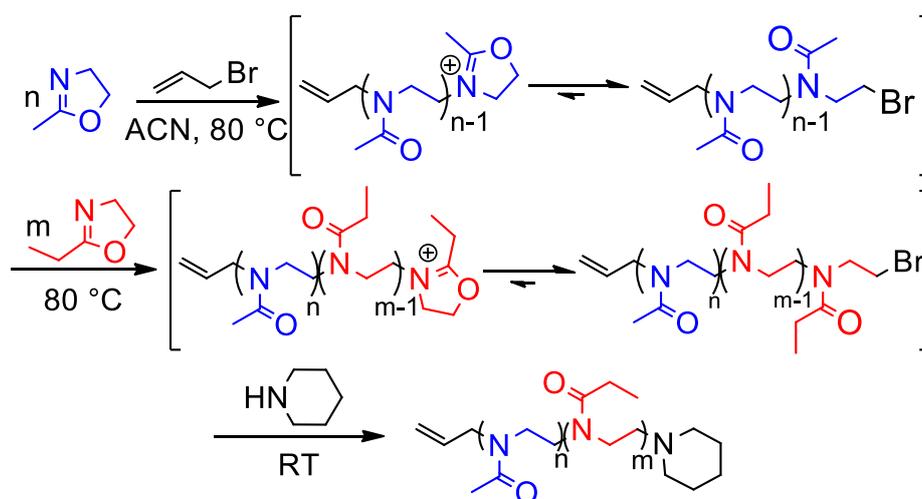


Schéma II.3 : Synthèse des copolymères PMeOx-*b*-PEtOx amorcés par le bromure d'allyle et terminés par de la piperidine.

Tableau II.5 : Synthèse de copolymères PMeOx-*b*-PEtOx.

Run ¹	MeOx/ EtOx/I/ Q	[MeOx] mol.L ⁻¹	[EtOx] mol.L ⁻¹	Time ² days	<i>p</i> ³ MeOx/EtOx % / %	<i>M_n</i> ⁴ kg.mol ⁻¹ (th)	<i>M_n</i> ⁵ kg.mol ⁻¹ (NMR)	<i>M_n</i> ⁶ kg.mol ⁻¹ (SEC DMF)	<i>D</i> ⁶	<i>M_n</i> ⁷ kg.mol ⁻¹ (SEC H ₂ O)	<i>D</i> ⁷
P ₁	35/91/ 1/5	1.5	2.8	3 (1+2)	nd/99.7	12.0 (3+9)	12.6 (3+9.6)	12.5	1.3	-	-
P ₂	234/31/ 1/10	1.5	0.197	8 (5+3)	98.6/100	22.7 (19.7+3)	23.1 (20+3.1)	12.4 (11.3+0.9)	2.0	17.3	1.3
P ₃	234/51/ 1/10	1.5	0.313	9 (5+4)	99.5/92.1	24.4 (19.8+4.6)	25.3 (20+5.3)	12.7 (11.8+0.7)	2.1	17.3	1.3

I and Q correspond respectively to the initiator and quencher; numbers noted in brackets characterize each block (the first number was related to MeOx).

¹: polymerizations initiated by allyl bromide and quenched by piperidine in ACN.

²: polymerization time

³: MeOx and EtOx conversions determined by ¹H NMR

⁴: M_n (th) = $([MeOx]_0 \times M(MeOx) \times p_{MeOx}) + ([EtOx]_0 \times M(EtOx) \times p_{EtOx}) / [I]_0$

⁵: determined by ¹H NMR

⁶: SEC in DMF; PMMA standards

⁷: SEC in water; absolute molar masses

L'analyse du milieu réactionnel et des polymères purifiés par RMN ¹H permet d'obtenir les taux de conversion des deux monomères ainsi que les masses molaires de chaque bloc. La conversion en MeOx et EtOx est déterminée à la fin de la polymérisation de chaque bloc par comparaison des signaux des protons méthylène du monomère dans la zone 3,6-4,0 ppm et des protons méthylène du squelette du polymère à 3,42 ppm. On observe des conversions très élevées pour la MeOx, ainsi celles-ci sont considérées égales à 100 % lors du calcul de la conversion en EtOx. La détermination de ces conversions permet de calculer les masses molaires théoriques des polymères ($M_{n\ th}$).

Sur le spectre RMN ¹H du polymère P₁ purifié, présenté en **Figure II.10** (les spectres RMN de P₂ et P₃ se trouvent en **Annexe II.1**), nous pouvons identifier les protons méthylène du squelette du polymère des unités MeOx et EtOx (protons 4 et 5 et protons 6 et 7 respectivement) à 3,42 ppm. Les protons méthyle des deux motifs de répétition ont des déplacements chimiques différents, à 2,07 ppm pour MeOx (protons 8) et 1,08 ppm pour EtOx (protons 10). Les protons allyliques des extrémités de chaîne observés entre 5,0 et 6,0 ppm ainsi que les protons méthyle des unités MeOx et EtOx (protons 8 et 10 respectivement) permettent de calculer les masses molaires des polymères ($M_{n\ RMN}$). Celles-ci sont comprises entre 12,6 et 25,3 kg.mol⁻¹ et sont en accord avec les valeurs théoriques.

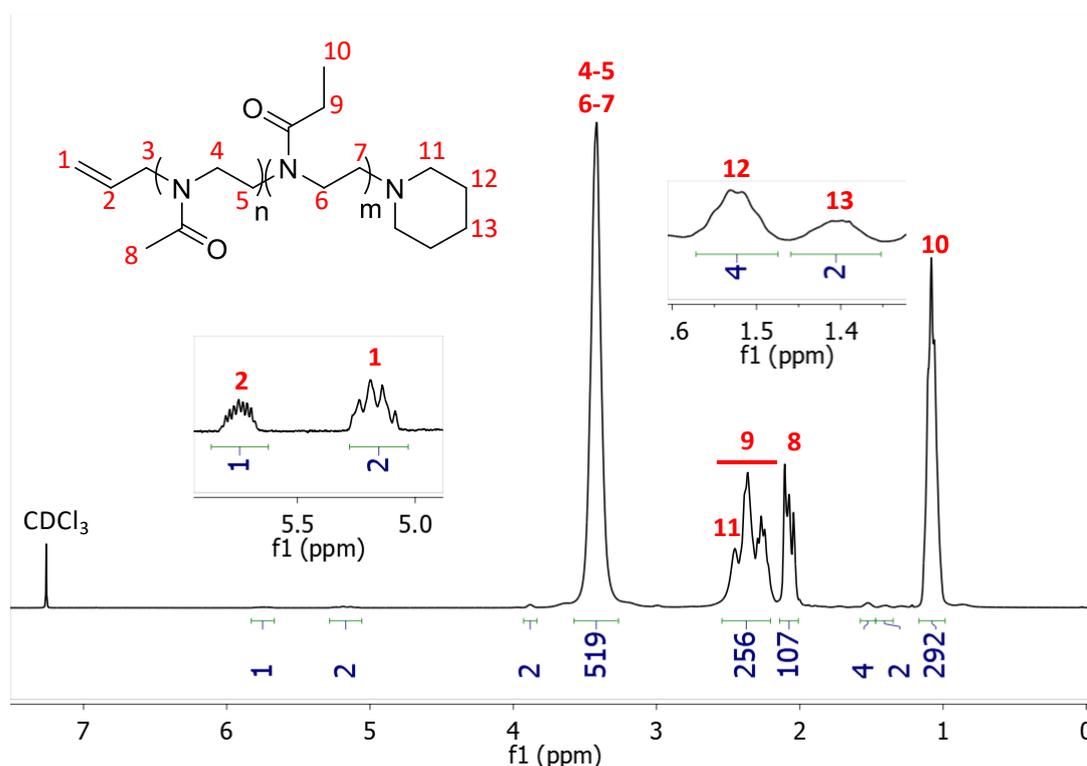


Figure II.10 : Spectre RMN ^1H de P_1 dans le CDCl_3 à $20\text{ }^\circ\text{C}$.

Les trois polymères synthétisés ont également été analysés par CES dans le DMF et dans l'eau. Les valeurs des masses molaires obtenues et des dispersités sont données dans le **Tableau II.5**. Pour P_1 , il n'y a pas eu de prélèvement avant l'ajout du monomère EtOx. C'est pourquoi uniquement la masse molaire totale du copolymère a été déterminée. La **Figure II.11** présente les chromatogrammes de chaque copolymère (P_x) et du prélèvement correspondant au bloc PMeOx (1^{er} bloc de P_x) noté $\text{P}_x\text{-PMeOx}$.

En ce qui concerne le copolymère P_1 , la dispersité est assez faible ($D = 1,3$) et la masse molaire ($M_{n\text{ SEC}}$) de $12,5\text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ est proche des valeurs obtenues théoriquement et par RMN ($12,0$ et $12,6\text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ respectivement) suggérant ainsi une polymérisation contrôlée.¹⁴ Pour les polymères P_2 et P_3 , contenant un taux d'unité MeOx plus élevé, les masses molaires sont plus faibles que celles attendues avec une dispersité plus large. La trainée visible aux faibles masses molaires met en évidence la propension à l'adsorption des chaînes PMeOx de hautes masses molaires sur les colonnes chromatographiques, ce qui explique ces résultats (phénomène précédemment observé pour les homopolymères PMeOx). Néanmoins, un déplacement des chromatogrammes des copolymères P_2 et P_3 vers les hautes masses molaires par rapport aux homopolymères correspondants ($\text{P}_2\text{-PMeOx}$ et $\text{P}_3\text{-PMeOx}$) est observé et est en accord avec l'ajout du bloc PEtOx sur le premier bloc PMeOx.

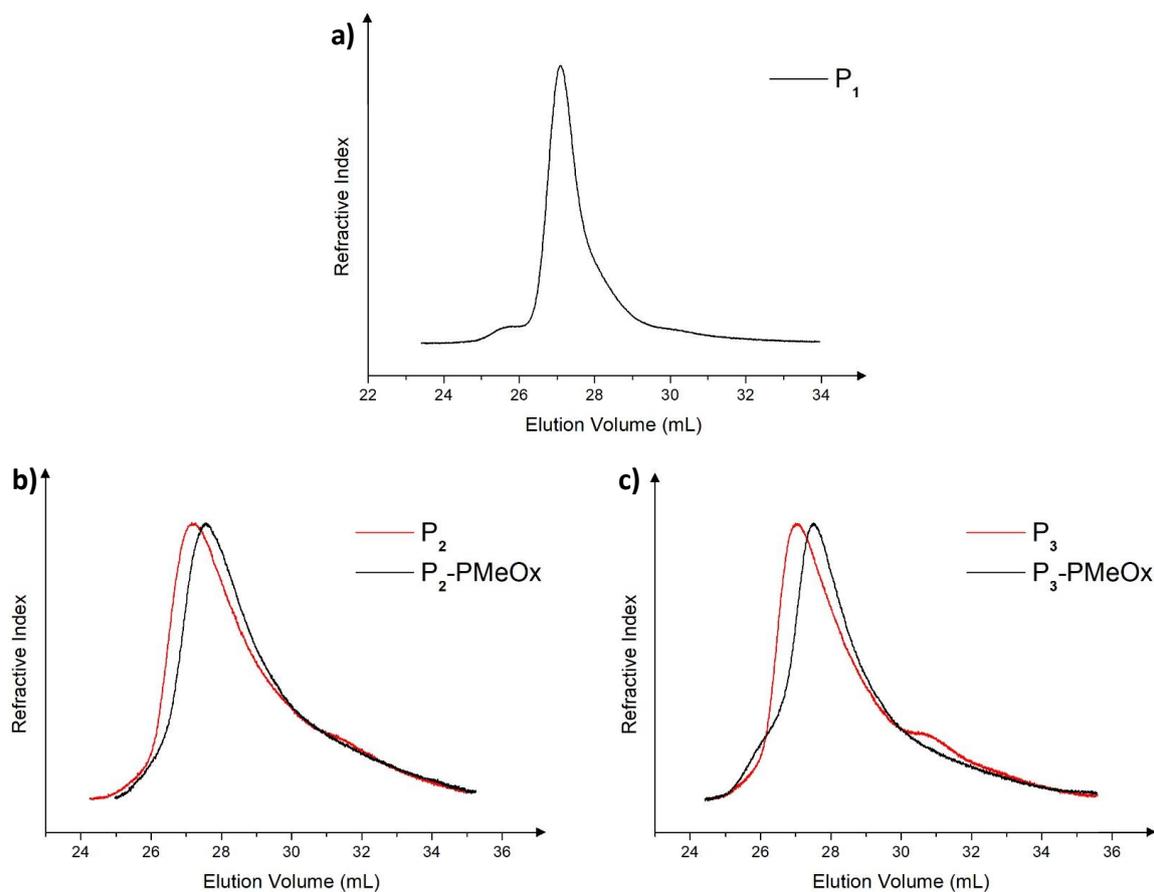


Figure II.11 : Chromatogrammes obtenus par SEC DMF des copolymères (a) P₁, (b) P₂ et (c) P₃ avec les prélèvements P₂-PMeOx et P₃-PMeOx.

Une caractérisation a également été effectuée par CES dans l'eau pour les copolymères P₂ et P₃ afin de s'affranchir de l'adsorption suspectée des chaînes PMeOx sur les colonnes de chromatographie de la CES DMF. Comme nous pouvons le voir sur la **Figure II.12**, chaque chromatogramme est monomodal et étroit dans ces conditions d'analyse ($D = 1,3$). De plus, les masses molaires ($17,3 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour P₂ et P₃) sont plus en accord avec les valeurs théoriques ($22,7$ et $24,4 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) et celles obtenues par RMN ($23,1$ et $25,3 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$).

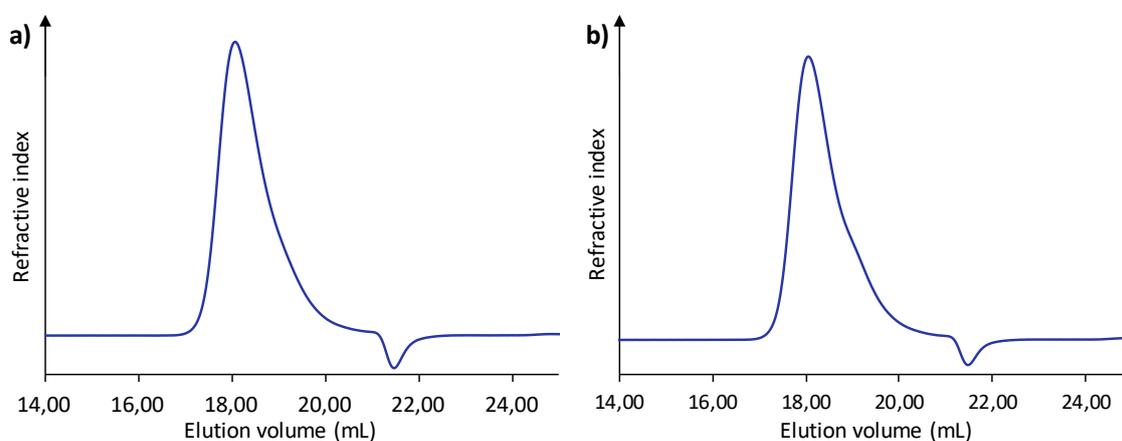


Figure II.12 : Chromatogrammes obtenus par CES aqueuse des copolymères (a) P₂ et (b) P₃.

II.2. Synthèse des copolymères poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-*b*-(2-méthyl-2-oxazoline)s

Tout d'abord, un polymère PMeOx-*b*-PiPrOx (P₄) a été synthétisé sur le même principe que les copolymères PMeOx-*b*-PEtOx avec un ajout séquentiel des deux monomères (1^{er} monomère : MeOx, 2^{ème} monomère : iPrOx). Ce polymère a été amorcé par du bromure d'allyle et terminé par de la pipéridine (**Tableau II.6**). Cependant, des analyses par CES DMF (**Figure II.13**) et par RMN DOSY ont montré la présence de deux populations, l'une correspondant au copolymère visé et l'autre à de l'homopolymère PiPrOx.

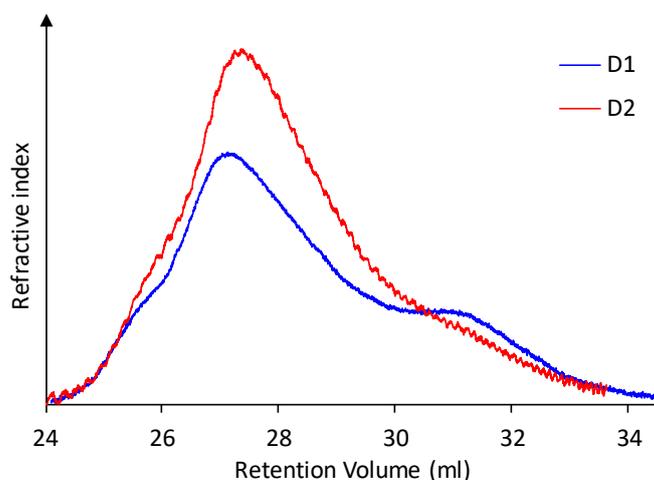


Figure II.13 : Chromatogrammes obtenus par CES DMF du polymère P₄ dialysé contre l'acétonitrile (D1) et dialysé contre d'eau (D2).

Deux coefficients de diffusion ont été mesurés par RMN DOSY, notamment pour les protons des unités iPrOx, dont la proportion est minoritaire dans le copolymère. A titre d'exemple, la décroissance du logarithme de l'intensité des protons méthyle des motifs iPrOx en fonction de $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ est présenté à la **Figure II.14**. En se basant sur l'équation de Stejskal-Tanner, ce graphe met en évidence 2 pentes, soit 2 objets diffusants ayant comme coefficient de diffusion : $D_1 = 1,27 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $D_2 = 7,9 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Par ailleurs, nous avons montré précédemment que la terminaison des chaînes polymère par la 1-(2-propynyl)pipérazine, l'agent de terminaison portant une triple liaison, ne permet pas de fonctionnaliser les chaînes polymère dans nos conditions opératoires. Pour ces deux raisons, l'ordre d'introduction des 2 monomères dans le milieu réactionnel a été inversé pour les polymérisations suivantes et un amorçage par le *p*-toluènesulfonate de propargyl a été effectué. La triple liaison terminale devant servir à introduire une molécule de ciblage sur le vecteur, ce groupement doit impérativement se situer à l'extrémité du bloc PiPrOx. Cette nouvelle stratégie

présente également l'avantage de visualiser plus aisément par CES le déplacement du chromatogramme après la polymérisation du 2nd bloc PMeOx, car celui-ci possède une masse molaire plus élevée.

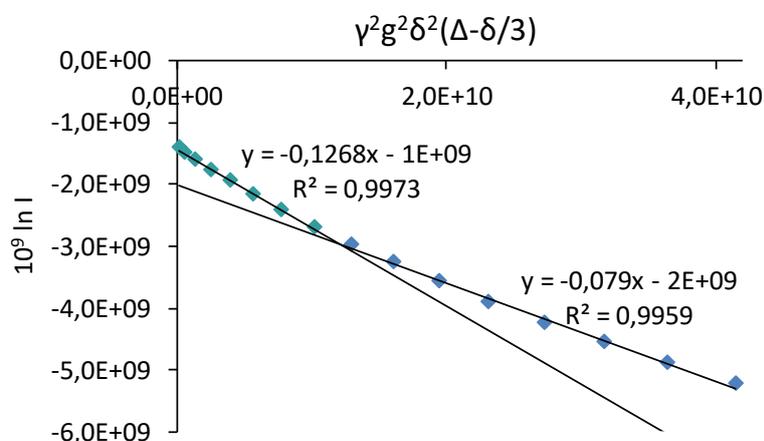


Figure II.14 : $\ln I$ versus $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ pour les protons méthyle des unités iPrOx situés entre 1,21 et 1,03 ppm (γ : rapport gyromagnétique, g : intensité du gradient de champ, δ : durée du gradient, Δ : temps entre 2 pulses de gradient) ; copolymère (P4).

Ainsi, des copolymères poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-*b*-(2-méthyl-2-oxazoline)s ont été synthétisés selon le **Schéma II.4**. Différents ratios iPrOx/MeOx ont été utilisés en conservant la même quantité de 2-isopropyl-2-oxazoline. Les polymères sont composés d'un premier bloc PiPrOx de masse molaire cible 5,7 kg.mol⁻¹ et d'un second bloc PMeOx dont la masse molaire cible est comprise entre 10 et 30 kg.mol⁻¹. Les polymères ont été amorcés par du *p*-toluène sulfonate de propargyle et terminé par de la pipéridine ou de la morpholine.

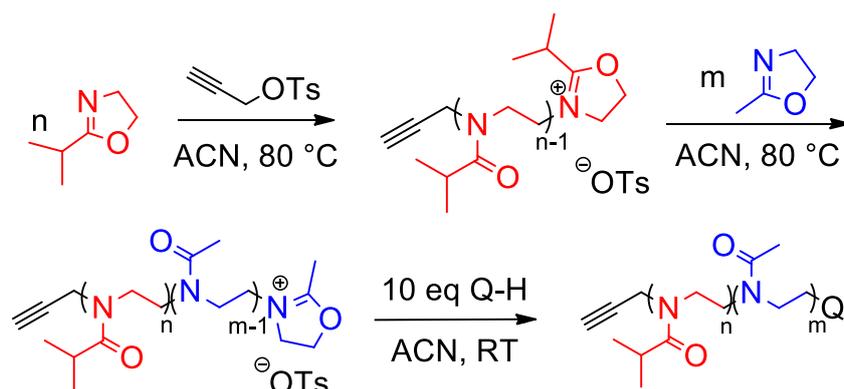


Schéma II.4 : Synthèse des copolymères PiPrOx-*b*-PMeOx.

Toutes les polymérisations sont réalisées à 80 °C avec une concentration constante en monomère de 1,5 mol.L⁻¹ (de l'acétonitrile est ajouté avec le second monomère pour conserver cette concentration). Avant l'ajout du second monomère ainsi qu'à la fin de la copolymérisation, un prélèvement du milieu réactionnel est effectué et analysé par RMN ¹H

pour déterminer la conversion de chaque monomère puis la masse molaire théorique de chaque bloc. Les conditions expérimentales et les analyses des polymères sont résumées dans le **Tableau II.6**. Les masses molaires des copolymères calculées par RMN et CES sont données après purification.

Tableau II.6 : Synthèse de copolymères PiPrOx-*b*-PMeOx.

Run ¹	iPrOx/MeOx/I/Q	[Ox] ² mol.L ⁻¹	Time ³ days	<i>p</i> ⁴ iPrOx/MeOx %	<i>M_n</i> ⁵ kg.mol ⁻¹ (th)	<i>M_n</i> ⁶ kg.mol ⁻¹ (NMR)	<i>M_n</i> ⁷ kg.mol ⁻¹ (SEC DMF)	<i>D</i> ⁷	<i>M_n</i> ⁸ kg.mol ⁻¹ (SEC H ₂ O)	<i>D</i> ⁸
P ₄	51/234/1/10	0.3/1.5	9 (5+4)	72 / 98.3	23.7 (4.1+19.6)	15.8 (3.0+12.8)	18.2 (4.0+14.2)	1.9	18.6 (1.1+17.5)	1.34
P ₅	51/352/1/10	1.5	9 (2+7)	98 / 98.5	35.2 (5.6+29.6)	26.1 (4.3+21.8)	26 (7+19)	1.46	25.4	1.19
P ₆	51/235/1/10	1.5	7 (2+5)	100 / 100	25.7 (5.7+20)	22.1 (4.7+17.4)	21.2 (7+14.2)	1.47	19.6	1.14
P ₇	51/235/1/10	1.5	6 (2+4)	100 / 96.6	25 (5.7+19.3)	17.7 (3.7+14)	21 (6.8+14.2)	1.40	-	-
P ₈	51/118/1/10	1.5	6 (3+3)	100 / 100	15.7 (5.7+10)	13.7 (5+8.7)	17.6 (7.3+10.3)	1.28	16.1	1.07

I and Q correspond respectively to the initiator and quencher; the numbers noted in brackets characterize each block (the first number was related to iPrOx).

¹: Polymerizations initiated by propargyl *p*-toluene sulfonate and quenched by morpholine, except for P₅ where piperidine was used

²: [iPrOx]₀ = [MeOx]₀ = 1.5 mol.L⁻¹ except for P₄ where [iPrOx]₀ = 0.3 mol.L⁻¹ and [MeOx]₀ = 1.5 mol.L⁻¹ (solvent: ACN)

³: polymerization time

⁴: iPrOx and MeOx conversions determined by ¹H NMR

⁵: M_n (th) = (([iPrOx]₀ × M(iPrOx) × *p*_{iPrOx}) + ([MeOx]₀ × M(MeOx) × *p*_{MeOx})) / [I]₀

⁶: determined by ¹H NMR

⁷: SEC in DMF, PMMA standards

⁸: SEC in H₂O, Triple (RI/LS/viscosimetric) detector, *M_n*^{LS}

La **Figure II.15** présente le spectre RMN ¹H du copolymère P₆ (les autres spectres RMN sont présentés en **Annexe II.2**). Le signal correspondant aux protons méthylène des unités iPrOx et MeOx (protons 4 et 5 et protons 6 et 7 respectivement) apparaît à 3,42 ppm, tandis que les protons méthyle des motifs iPrOx et MeOx résonnent respectivement à 1,12 ppm (protons 9) et 2,13 ppm (protons 10). Les protons méthine des iPrOx ont un déplacement chimique compris entre 2,7 ppm et 3,1 ppm (protons 8). Les masses molaires RMN des polymères sont calculées en considérant les protons méthylène des extrémités de chaîne (protons 3 en alpha de la triple liaison), dont le déplacement chimique se situe entre 4,2 et 4,4 ppm, et les protons méthyle des unités iPrOx et MeOx (protons 9 et 10 respectivement). Néanmoins, l'intégrale du signal corrélé aux protons 3 est parfois impactée par le signal voisin correspondant aux protons méthylène des unités iPrOx et MeOx. Cela explique la différence entre certaines valeurs théoriques et RMN en particulier pour les plus hautes masses molaires. Les conversions des

deux monomères ont été calculées en se basant sur le signal des protons méthylène des monomères résiduels situé entre 3,6 et 4,0 ppm et le signal des protons méthylène du squelette du polymère à 3,6 ppm lors de l'analyse par RMN ^1H des milieux réactionnels.

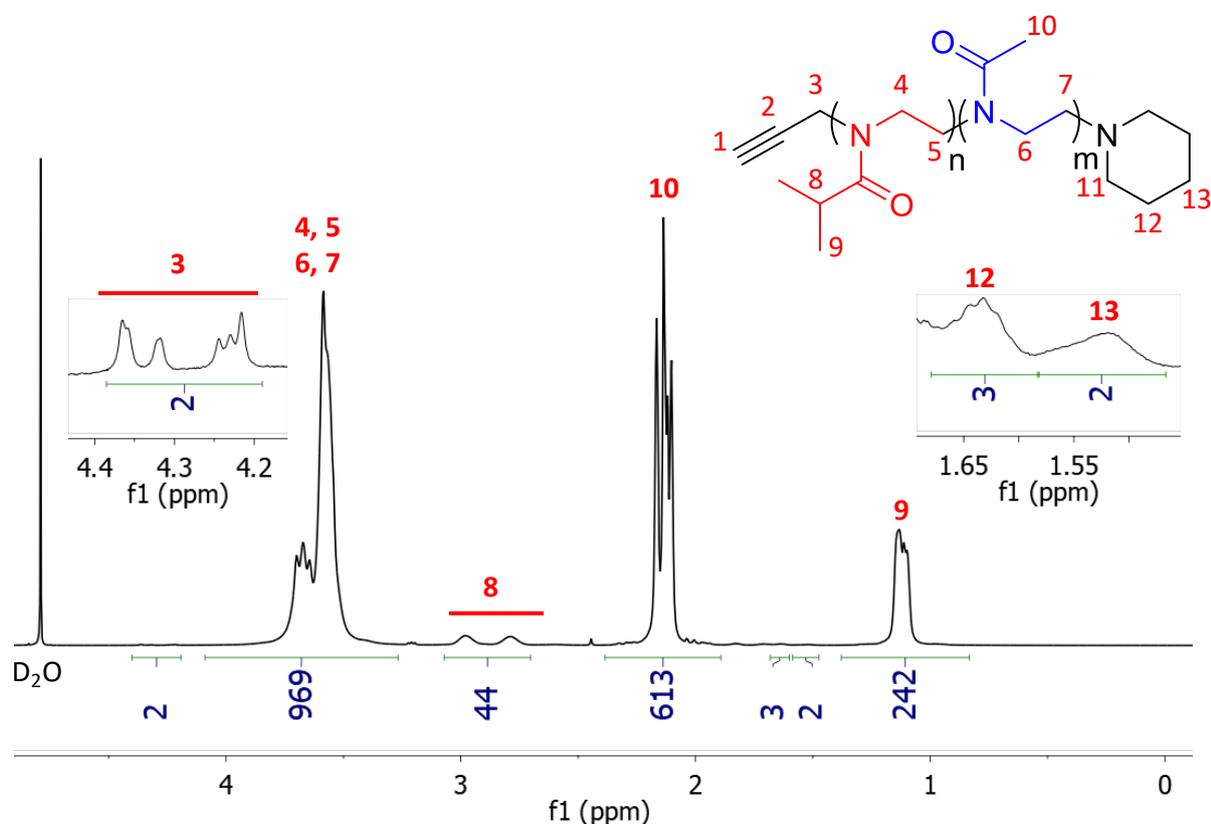


Figure II.15 : Spectre RMN ^1H du copolymère P_6 dans D_2O à 20 °C.

Les masses molaires des copolymères ont été déterminées par CES DMF et varient de 17,6 à 26 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ avec une dispersité comprise entre 1,28 et 1,46. Ces valeurs augmentent avec la quantité de MeOx mais restent, néanmoins, inférieures aux valeurs théoriques attendues. Comme précédemment suggéré, l'adsorption des blocs PMeOx de hautes masses molaires sur les colonnes de la CES serait à l'origine de ces valeurs plus faibles. La **Figure II.16.a** présente les chromatogrammes du copolymère P_6 et du bloc PiPrOx (avant l'addition du deuxième monomère) obtenus par CES DMF. Ici encore, une large trainée est observée. Cependant, le déplacement du chromatogramme vers les hautes masses molaires montre l'addition du second bloc, PMeOx, sur toutes les chaînes PiPrOx. Pour confirmer cette interprétation, les copolymères ont également été caractérisés par SEC aqueuse. Comme nous pouvons le voir sur la **Figure II.16.b**, le chromatogramme du copolymère est monomodal et étroit dans ces conditions d'analyses ; des résultats similaires sont obtenus pour les autres copolymères ($D = 1,07$ à 1,19). Toutefois, les valeurs des masses molaires sont similaires quelles que soient les conditions d'analyses par CES (DMF ou H_2O). En ce qui concerne les chromatogrammes des

blocs PiPrOx par CES aqueuse, deux pics apparaissent systématiquement dû à l'agrégation partielle des chaînes à la température d'analyse (35 °C), cette température étant proche de la LCST de l'homopolymère (≈ 45 °C). Nous observons, tout de même, un déplacement du chromatogramme vers les masses molaires plus élevées après la polymérisation du second bloc comme dans le cas de la CES DMF.

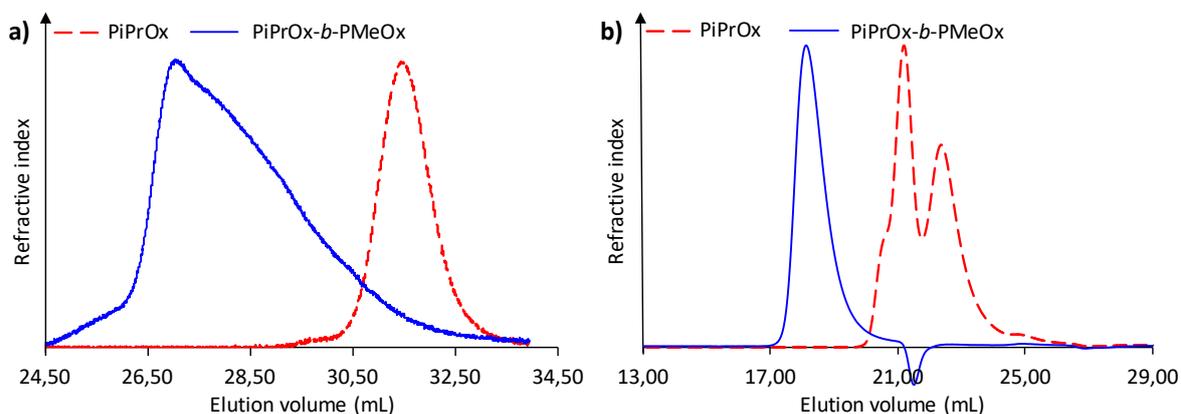


Figure II.16 : Chromatogrammes du copolymère P₆ et du prélèvement PiPrOx obtenus par CES (a) DMF et (b) aqueuse.

Le copolymère P₆ a également été caractérisé par RMN DOSY afin de confirmer sa structure. Comme le montre la **Figure II.17**, quel que soit le signal considéré, un unique coefficient de diffusion égal à $(3,30 \pm 0,3) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ est obtenu. Ce résultat indique que les protons appartenant aux unités iPrOx et MeOx diffusent à la même vitesse en solution. La masse molaire du bloc PMeOx étant bien plus élevée que celle du bloc PiPrOx, cette analyse confirme la structure du copolymère P₆. Dans le cas d'un mélange d'homopolymères, deux coefficients très distincts auraient été observés. De plus, la faible valeur de l'écart type et les décroissances monoexponentielles observées pour tous les signaux démontrent que les coefficients de diffusion sont monodisperses. La **Figure II.18** présente par exemple cette décroissance pour le signal des protons méthyle des unités iPrOx. Ainsi l'échantillon est homogène et bien défini. Cela conforte l'hypothèse de l'adsorption du bloc PMeOx de haute masse molaire sur les colonnes de la CES DMF.

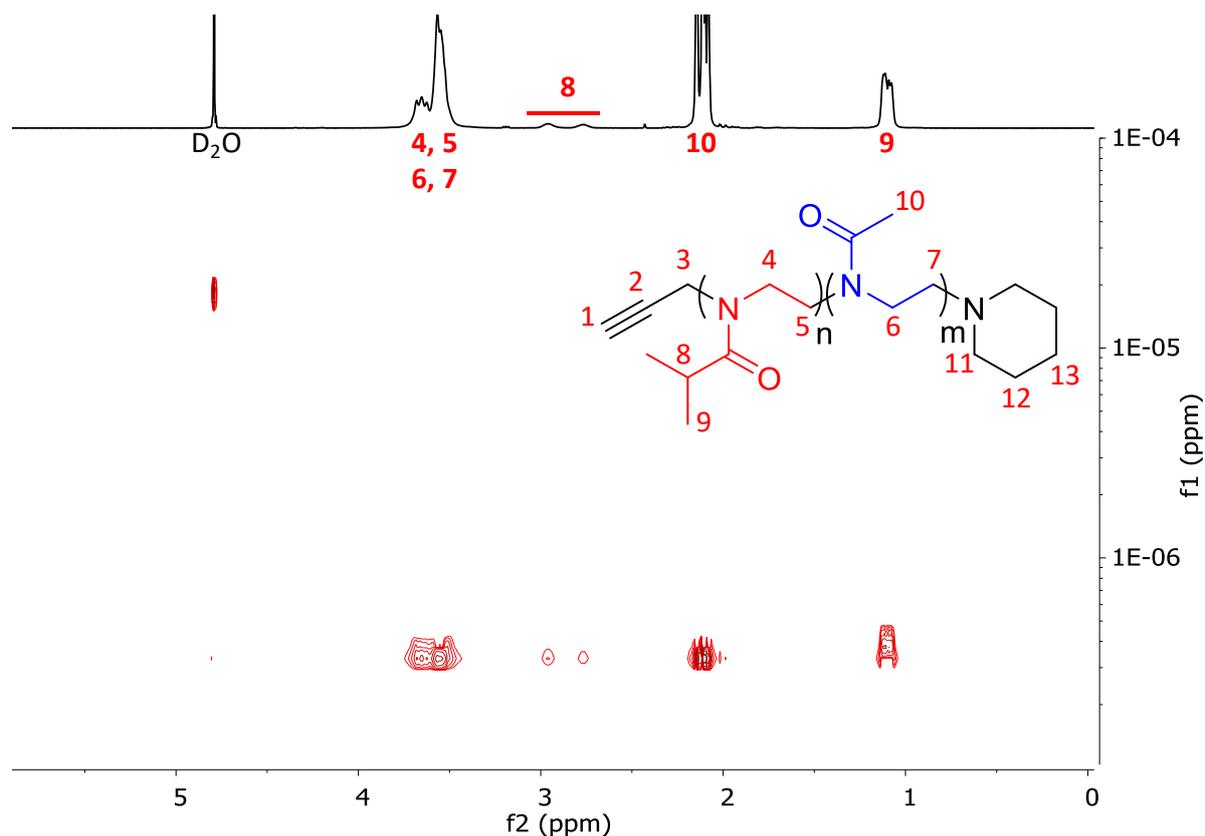


Figure II.17 : Spectre RMN DOSY du copolymère P₆ dans D₂O à 25°C.

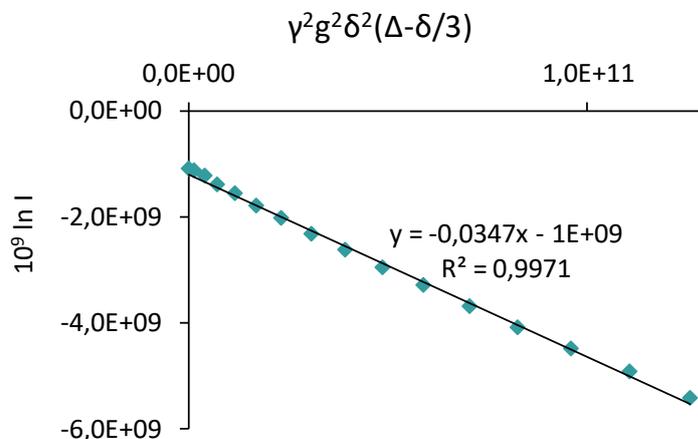


Figure II.18 : $\ln I$ versus $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ pour les protons méthyle des unités iPrOx situés entre 1,21 et 1,03 ppm ; copolymère (P₆).

Pour conclure, la synthèse de deux types de copolymères à blocs poly(2-oxazoline)s a été menée avec succès. Ces copolymères présentent un bloc PMeOx et un bloc PEtOx ou PiPrOx et comportent différents ratios MeOx/EtOx ou MeOx/iPrOx. La différence d'hydrophilie entre les deux monomères de chaque copolymère permet alors d'envisager une hydrolyse sélective des motifs dans le but d'obtenir les copolymères PEI-*b*-POx souhaités.

Partie II. Synthèse des copolymères à blocs PEI-*b*-POx

I. Hydrolyse des homopolymères

Avant de nous intéresser à l'hydrolyse des copolymères, nous avons réalisé l'hydrolyse de différents homopolymères, principalement des PMeOx, dans le but de déterminer des conditions permettant une hydrolyse supérieure à 95 % des motifs MeOx.

I.1. Hydrolyse des homopolymères témoins des PMeOx-*b*-PEtOx

Tout d'abord, les homopolymères témoins des copolymères PMeOx-*b*-PEtOx ont été hydrolysés. L'hydrolyse d'une PMeOx d'une part (GwD-05) et d'une PEtOx (GwD-16) d'autre part, ont été réalisées par voie basique en s'inspirant des travaux de Brissault *et al.*⁴ Ces conditions utilisées au laboratoire ont été appliquées aux deux homopolymères. Les conditions des réactions réalisées et les résultats obtenus sont répertoriés dans le **Tableau II.7**.

Tableau II.7 : Hydrolyses basiques d'homopolymères POx pour la synthèse de PEI témoins.

Run	Polymer used	Polymer type	M_n^1 kg.mol ⁻¹	Ox/OH ⁻	T h	[Unit Ox] mol.L ⁻¹	Hydrolysis %
GwD-05	PLL 13	PMeOx	15.5	1/2.1	46	0.852	97
GwD-16	GwD-08	PEtOx	9.9	1/2.1	47	0.852	3

¹ : Molar mass of the initial polymer (before hydrolysis)

Les polymères ont été analysés par RMN ¹H après purification par dialyse contre l'eau afin de déterminer les taux d'hydrolyse. Le spectre RMN ¹H du polymère purifié GwD-05 est présenté à la **Figure II.19**.

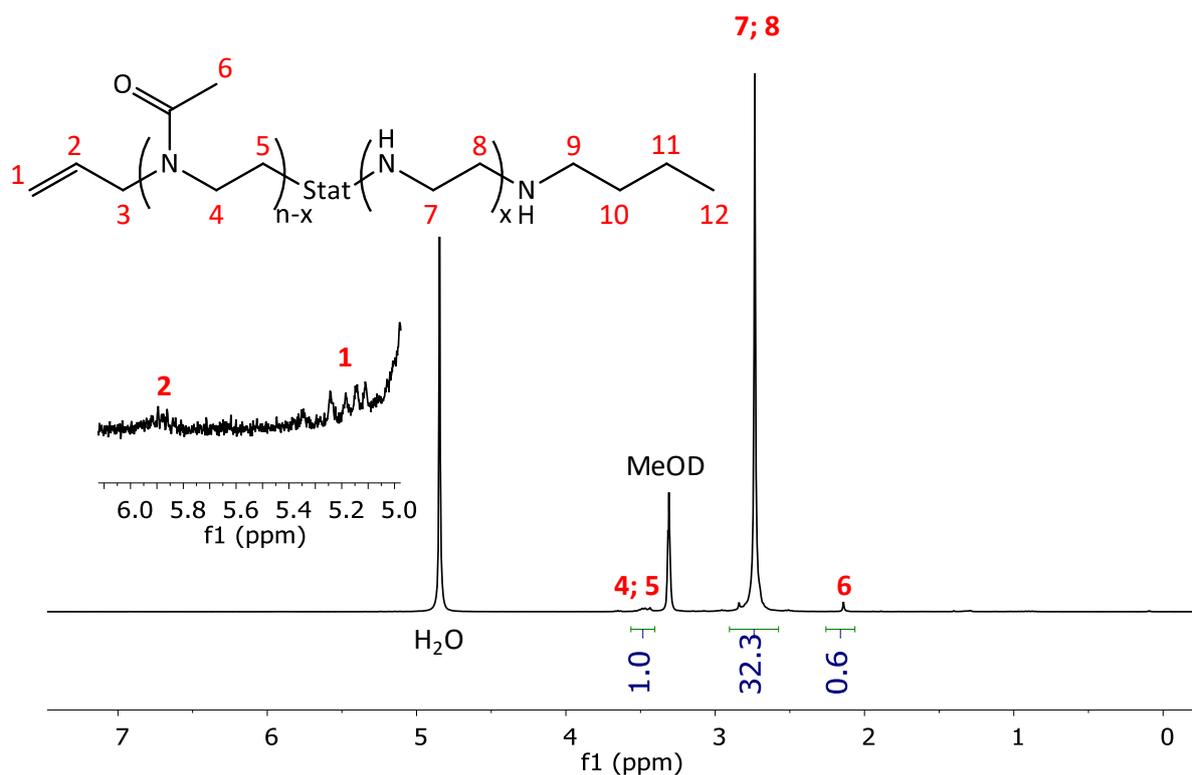


Figure II.19 : Spectre RMN ^1H de GwD-05 dans MeOD à 20 °C.

En calibrant le spectre avec les protons allyliques (protons 1 et 2), les intégrales des signaux corrélés aux motifs MeOx résiduels (protons 4, 5 et 6) et aux motifs EI (protons 7 et 8) se sont révélées beaucoup plus élevées qu'attendues. Ce résultat a été attribué à une hydratation de la double liaison des extrémités de chaîne lors de l'étape d'hydrolyse. A noter que la teneur en doubles liaisons allyliques dans les POx, avant la réaction d'hydrolyse, était cohérente aux valeurs attendues puisque les masses molaires RMN des polymères calculées sur la base de ces signaux coïncidaient avec les masses molaires théoriques. Ainsi, la double liaison ne semble pas stable lors de la réaction d'hydrolyse.

Néanmoins, le taux d'hydrolyse peut être déterminé par comparaison des signaux des protons méthylène des unités MeOx non hydrolysées (protons 4 et 5) et des protons méthylène des unités MeOx hydrolysées (protons 7 et 8). En posant p le taux d'hydrolyse, l'intégrale du signal entre 3,4 et 3,7 ppm correspondant aux protons 4 et 5 est proportionnelle à $4\text{H} \times (1-p)$ et l'intégrale du signal entre 2,5 et 3 ppm correspondant aux protons 7 et 8 est proportionnelle à $4\text{H} \times p$. Ainsi, l'**Équation II.1** peut être écrite. Cette méthode de calcul sera utilisée lors de l'hydrolyse d'homopolymères, quel que soit leur nature chimique. Il est à noter que la réaction de déacylation se fait statistiquement le long de la chaîne polymère. Il en résulte un copolymère

statistique. Si la proportion d'une des 2 unités est très minoritaire, la structure du copolymère est alors très proche de celle d'un homopolymère.

$$I_{H(4-5)} \leftrightarrow 4 \times (1 - p)$$

$$I_{H(7-8)} \leftrightarrow 4p$$

Équation II.1 Soit $p = \frac{I_{H(7-8)}}{I_{H(7-8)} + I_{H(4-5)}}$

Dans le cas de GwD-05, ces conditions permettent d'hydrolyser 97 % des motifs MeOx, alors que pour GwD-16, un très faible taux d'hydrolyse est obtenu (3 %). Cette sélectivité est en lien avec de précédentes études. Par exemple, Tanaka *et al.*¹⁵ ont étudié l'hydrolyse basique d'un homopolymère PPhOx qui ne fut pas concluante. D'autre part, l'hydrolyse basique de PEtOx dans ces conditions a, également, été étudiée par Plet *et al.*¹⁶ mais ne fut pas satisfaisante.

Dans notre étude, la sélectivité observée permet d'envisager une hydrolyse sélective des copolymères PMeOx-*b*-PEtOx.

I.2. Hydrolyse des homopolymères PMeOx témoins des PiPrOx-*b*-PMeOx

Les hydrolyses des PMeOx correspondant aux copolymères PiPrOx-*b*-PMeOx synthétisés, ont été réalisées par voie acide dans l'eau. Les conditions expérimentales et les résultats sont présentés dans le **Tableau II.8**.

Tableau II.8 : Hydrolyse des PMeOx témoins des copolymères PiPrOx-*b*-PMeOx.

Run	Polymer used	M_n^1 kg.mol ⁻¹	Ox/H ⁺	T h	[Unit Ox] mol.L ⁻¹	Hydrolysis %
GwD-132	GwD-84	30	1/9	16.5	0.48	96.2
GwD-137	GwD-133	20	1/9	16.5	0.48	95.6
GwD-138	GwD-134	10	1/9	16.5	0.48	94.8

¹ : Molar mass of the initial polymer (before hydrolysis)

Ces hydrolyses réalisées dans des conditions connues au laboratoire¹⁷ ont permis la déacylation de plus de 95 % des unités MeOx. Des polymères /PEI comportant peu d'unités MeOx résiduelles sont ainsi obtenus. Les masses molaires des polymères initiaux ne semble

pas impacter l'hydrolyse des unités MeOx, même si l'on note la présence systématique d'unités non hydrolysées sur tous les polymères utilisés.

Les polymères utilisés dans cette étude sont amorcés par le *p*-toluène sulfonate de propargyle portant une triple liaison. La stabilité de cette triple liaison pendant la réaction d'hydrolyse a, donc, été étudiée. Notons que Grayson et coll.¹⁸ ont hydrolysé par catalyse acide des PEtOx amorcés également par le *p*-toluène sulfonate de propargyle. Ils ont démontré par RMN ¹H que le signal corrélé à la triple liaison persistait après la réaction d'hydrolyse cependant aucune quantification des signaux n'est discutée. Les protons méthylène en α de la triple liaison présentent un signal à 4,1 ppm avant hydrolyse puis à 3,8 ppm après.

Ainsi, afin de vérifier ces résultats, les polymères GwD-132, GwD-137 et GwD-138 ont été analysés par RMN ¹H après purification par dialyse contre l'eau. La **Figure II.20** présente le spectre RMN ¹H du polymère GwD-137.

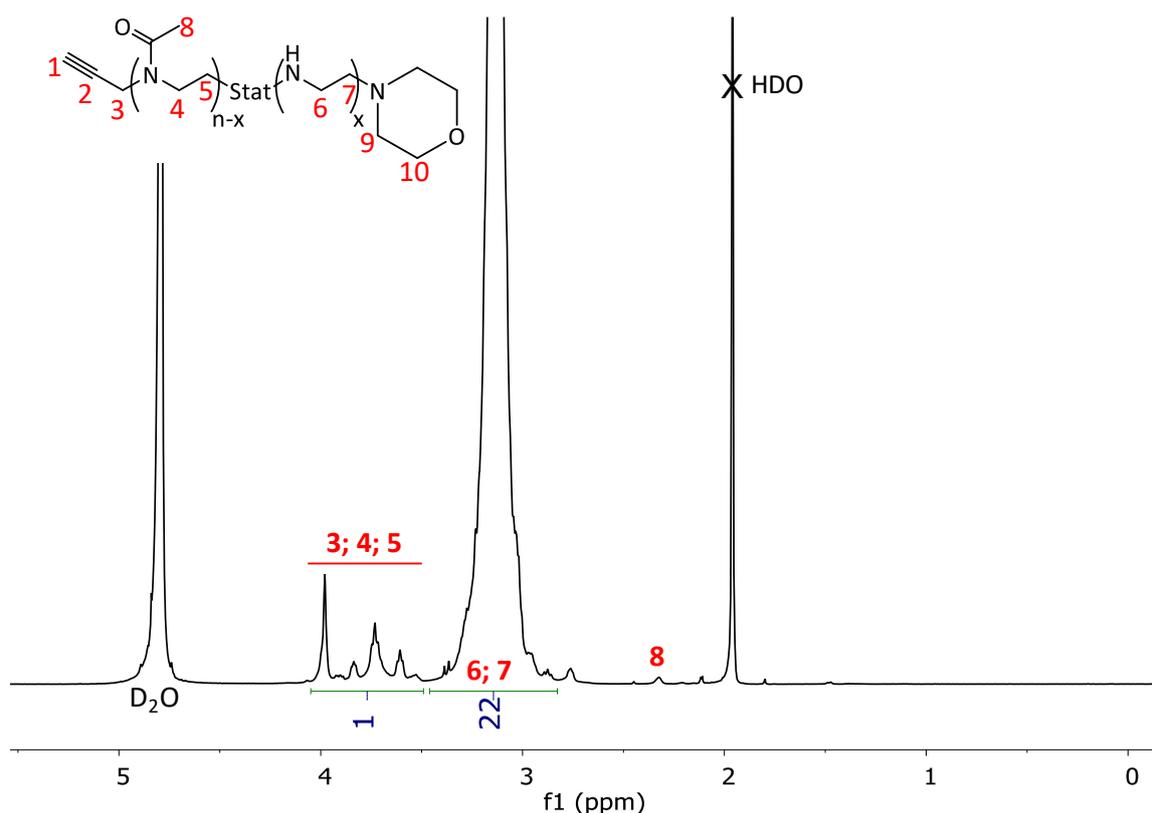
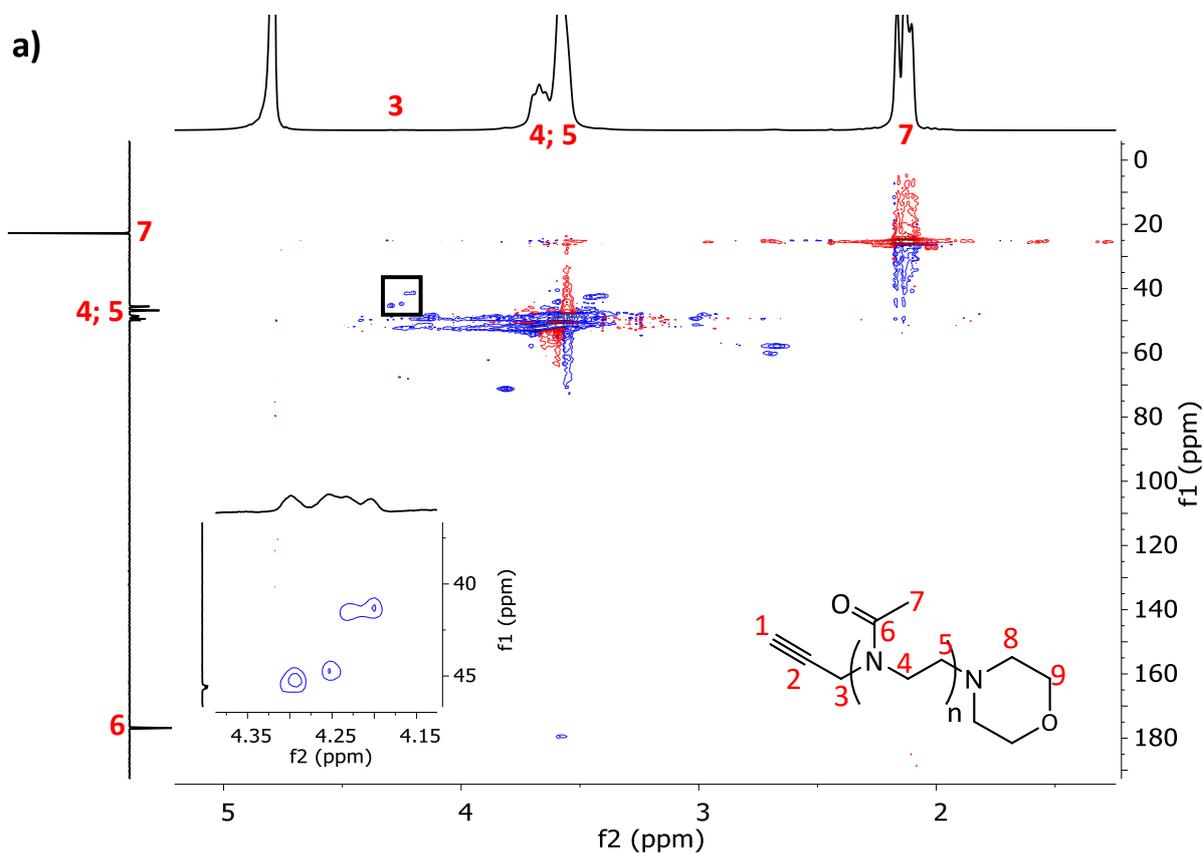


Figure II.20 : Spectre RMN ¹H du polymère GwD-137 dans D₂O.

Cependant, lors de nos réactions d'hydrolyse, la déacylation des MeOx n'étant pas de 100 %, le signal des protons en α de la triple liaison (protons 3) n'est pas isolé sur le spectre RMN ¹H du polymère hydrolysé. Afin de confirmer la stabilité de la triple liaison dans nos

conditions d'hydrolyse, une analyse par RMN HSQC sur une PMeOx avant et après hydrolyse est alors réalisée. Les spectres 2D correspondant aux polymères GwD-133 et GwD-137 (hydrolyse de GwD-133) sont présentés à la **Figure II.21 a et b**. Les protons 3 du polymère GwD-133 ayant un signal vers 4,25 ppm et les carbones 3 se trouvant dans la zone entre 40 à 45 ppm, le couplage C-H est visible en HSQC. Après hydrolyse, sur le spectre RMN ^1H du polymère GwD-137, un signal isolé des protons 3 n'étant pas identifiable, la RMN HSQC nous apporte l'information nécessaire : un couplage C-H est présent avec un signal dans la zone 38 à 46 ppm en carbone et dans la zone 3,7 à 3,75 ppm pour le proton correspondant au couplage entre le carbone 3 et le proton 3 comme attendu. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Grayson et coll.¹⁸ ainsi qu'avec les simulations RMN ^{13}C présentes en **Annexe II.3**.



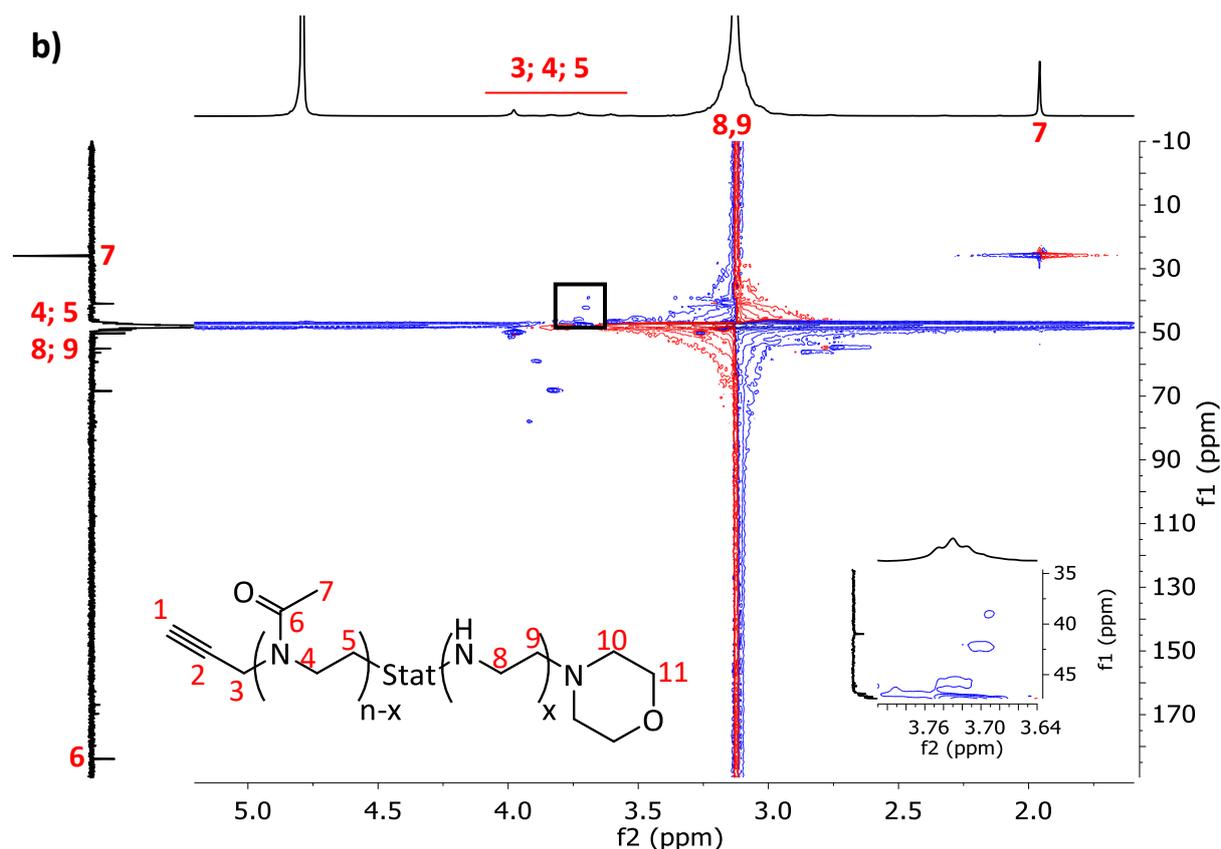


Figure II.21 : Spectres RMN HSQC des polymères (a) GwD-133 et (b) GwD-137 dans D₂O.

Ainsi, l'hydrolyse acide de ces homopolymères PMeOx permet une déacylation supérieure à 95 % ainsi qu'une conservation de l'extrémité de chaîne alcyne. Néanmoins, il n'a pas été possible de les quantifier.

Pour conclure, les hydrolyses des homopolymères poly(2-oxazoline)s témoins ont permis de valider des conditions opératoires susceptibles de conduire à une hydrolyse sélective des copolymères. Cette étude a également mis en évidence l'instabilité de la double liaison terminale des polymères dans les conditions d'hydrolyse utilisées. Pour les polymères portant une triple liaison terminale, la conservation de la fonction alcyne a pu être démontrée sans pouvoir la quantifier. Néanmoins, celle-ci sera disponible pour une post-fonctionnalisation des chaînes polymère. De plus, les PEI synthétisées dans cette étude seront utilisées dans les tests biologiques pour visualiser l'intérêt de la structure des copolymères PEI-*b*-POx dans le transfert de gènes.

II. Hydrolyse des copolymères poly(2-méthyl-2-oxazoline)-*b*-(2-éthyl-2-oxazoline)s

Dans le but d'obtenir des copolymères PEI-*b*-PEtOx, une hydrolyse sélective des polymères PMeOx-*b*-PEtOx doit être opérée. Une auto-organisation des polymères en solution est alors nécessaire, comme présentée dans le **Schéma II.1**. C'est pourquoi, avant de réaliser l'hydrolyse des polymères, leur caractère thermosensible sera d'abord étudié. Puis, ces polymères seront hydrolysés par voie acide ou basique dans le but d'obtenir une hydrolyse la plus sélective possible.

II.1. Thermosensibilité des copolymères PMeOx-*b*-PEtOx

L'aggrégation du copolymère en solution à haute température est une propriété importante dans cette étude. La formation de micelles avec un cœur PEtOx et une couronne PMeOx à haute température avant l'ajout d'HCl ou de NaOH doit préserver le bloc PEtOx de l'hydrolyse (**Schéma II.1**). Un second point important est lié à l'application visée : les copolymères à blocs double hydrophiles PEI-*b*-PEtOx doivent être solubles en solution aqueuse à température ambiante mais également à la température corporelle.

Les PEtOx ayant une LCST de l'ordre de 70 °C et les PMeOx étant totalement solubles dans l'eau, les copolymères PEtOx-*b*-PMeOx devraient avoir une température de transition de phase autour de 70 °C, avec des fluctuations, en fonction du ratio EtOx/MeOx et de la masse molaire du copolymère. Ainsi, une analyse par nano-DSC a été réalisée afin de déterminer la température de transition de phase des copolymères synthétisés en utilisant la même concentration en polymère que lors d'une réaction d'hydrolyse ($[unités\ Ox] = 0,48\ M$). P₁ n'a pas été analysé car le bloc PMeOx est trop court pour une application en thérapie génique. P₂ et P₃ ont, quant à eux, été analysés et les thermogrammes obtenus sont présentés en **Figure II.22**. Cependant, aucune transition de phase n'a été observée pour les deux copolymères sur la gamme de température étudiée (5 °C - 130 °C). Pour conclure, les copolymères PEtOx-*b*-PMeOx synthétisés ne possèdent pas de propriétés thermosensibles, probablement dû au fait que la partie hydrophobe n'est pas assez importante par rapport à celle hydrophile.

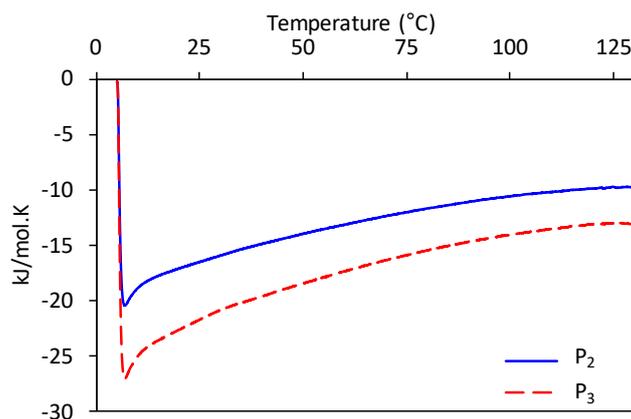


Figure II.22 : Analyse par nano-DSC des copolymères $\text{PMeO}_x\text{-}b\text{-PEtO}_x$ P_2 et P_3 avec $[\text{unités Ox}] = 0,48 \text{ M}$ dans l'eau. Rampe de 5°C à 130°C , vitesse $1^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

II.2. Hydrolyse basique ou acide des copolymères $\text{PMeO}_x\text{-}b\text{-PEtO}_x$

Malgré l'absence d'auto-organisation lors du chauffage des solutions de copolymères, des expériences d'hydrolyse ont été réalisées. Hoogenboom et coll.⁷ ont mis en évidence une certaine sélectivité lors de l'hydrolyse acide de copolymères $\text{PMeO}_{50}\text{-}b\text{-PEtO}_{50}$. La sélectivité varie selon le solvant utilisé et décroît drastiquement avec le degré d'hydrolyse des unités MeO_x au cours de la réaction. Par exemple, dans un milieu éthanol-eau (80/20 v/v), les unités MeO_x sont 13 fois plus hydrolysées que les unités EtO_x au début de la réaction, c'est-à-dire quand le taux d'hydrolyse des unités MeO_x est de 30 %. Cette valeur diminue à 3 pour un degré d'hydrolyse des MeO_x de 70 %. Le but de notre étude, ici, est de déterminer des conditions permettant d'obtenir la meilleure sélectivité possible avec un degré d'hydrolyse des unités MeO_x supérieur à 95 % pour les différents copolymères synthétisés. Les copolymères P_2 et P_3 ont un taux d'unité MeO_x plus élevé (88,3 % et 82,1 % respectivement) que celui étudié par Hoogenboom et coll. Il est intéressant d'évaluer les degrés d'hydrolyse des deux blocs lorsque la réaction est réalisée sans auto-organisation du bloc hydrophobe. Deux types d'hydrolyse ont été étudiés ici : par voie basique ou par voie acide (**Schéma II.5**). Les conditions d'hydrolyse testées et les résultats obtenus sont reportés dans le **Tableau II.9**.

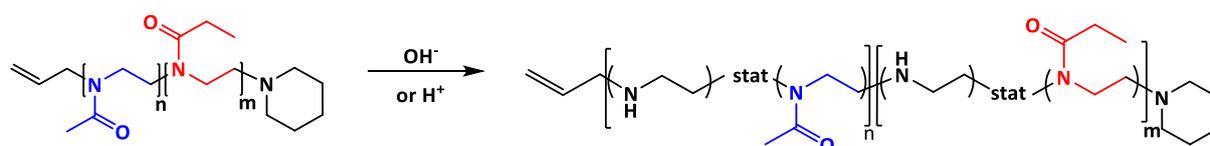


Schéma II.5 : Synthèse des copolymères $\text{PEtO}_x\text{-}b\text{-PEI}$.

Tableau II.9 : Synthèse de PEtOx-*b*-PEI.

Run	Polymer used	M_n^1 MeOx (kg.mol ⁻¹)	M_n^1 EtOx (kg.mol ⁻¹)	Conditions	Solvent	Time (h)	H ⁺ or OH ⁻ /unit ^{a)}	MeOx Hydrolysis (%)	EtOx Hydrolysis (%)
H P1-1				Basic	H ₂ O	48	2.1	Insoluble	
H P1-2				Basic	H ₂ O	72	2.1	Insoluble	
H P1-3	P ₁	3	9	Acid	H ₂ O	16	9.1	100	100
H P1-4				Acid	H ₂ O	16	6.6	64.2	78.5
H P1-5				Acid	H ₂ O	16	4	≈ 100	
H P1-6				Acid	H ₂ O	16	2	No hydrolysis	
H P2-1	P ₂	20	3	Basic	H ₂ O	48	1	Insoluble	
H P2-2				Acid	EtOH/H ₂ O 8/2	24	6.6	85	68,3
H P3-1				Acid	PrOH ^b /H ₂ O 8/2	24	6.6	98	100
H P3-2				Acid	DCM/H ₂ O 8/2	24	6.6	96	84
H P3-3				Acid	EtOH/H ₂ O 8/2	10	6.6	82.5	53.9
H P3-4	P ₃	20	5	Acid	MeOH/H ₂ O 8/2 + NaCl	14	6.6	86	67
						19		86	82
H P3-5				Acid	PrdiOH ^c /H ₂ O 8/2 + NaCl	6	6.6	90	55.7
						9		93	66
H P3-6				Acid	PrdiOH ^c /H ₂ O 8/2	6	6.6	55	18

¹ M_n th

a) MeOx + EtOx units

b) PrOH = 1-propanol

c) PrdiOH = 1,2-propanediol

Au vu de la sélectivité obtenue sur les homopolymères PMeOx et PEtOx par voie basique (97 % et 3 % d'hydrolyse respectivement), des hydrolyses par cette voie ont été réalisées sur les copolymères P₁ et P₂ (H_{P1-1}, H_{P1-2} et H_{P2-1}), cependant ces expériences ont conduit à la formation de produits insolubles. Ce phénomène a également été observé au laboratoire pour d'autres réactions. C'est pourquoi, la voie acide a été, par la suite, plus largement étudiée.

Les essais d'hydrolyse acide du copolymère P₁ montrent majoritairement l'absence de sélectivité, bien que nous observions pour la réaction H_{P1-4} une légère sélectivité en faveur de EtOx, contraire à ce que l'on attend.

En ce qui concerne l'hydrolyse du copolymère P₃ (H_{P3-3}), la réaction a été réalisée dans un mélange EtOH/H₂O (80/20 v/v) et plusieurs prélèvements ont été effectués au cours du temps afin de suivre la réaction. Tous les prélèvements sont purifiés par dialyse contre l'eau, séchés par lyophilisation puis analysés par RMN ¹H dans D₂O. La superposition des différents

spectres RMN ^1H permet de voir la modification des signaux au cours du temps ainsi que l'apparition des signaux correspondant aux motifs éthylènimine dans la zone 2,75-3,5 ppm (**Figure II.23**). L'attribution des différents protons est indiquée précisément sur la **Figure II.23**. La modification chimique du copolymère se fait statistiquement le long de la chaîne polymère.

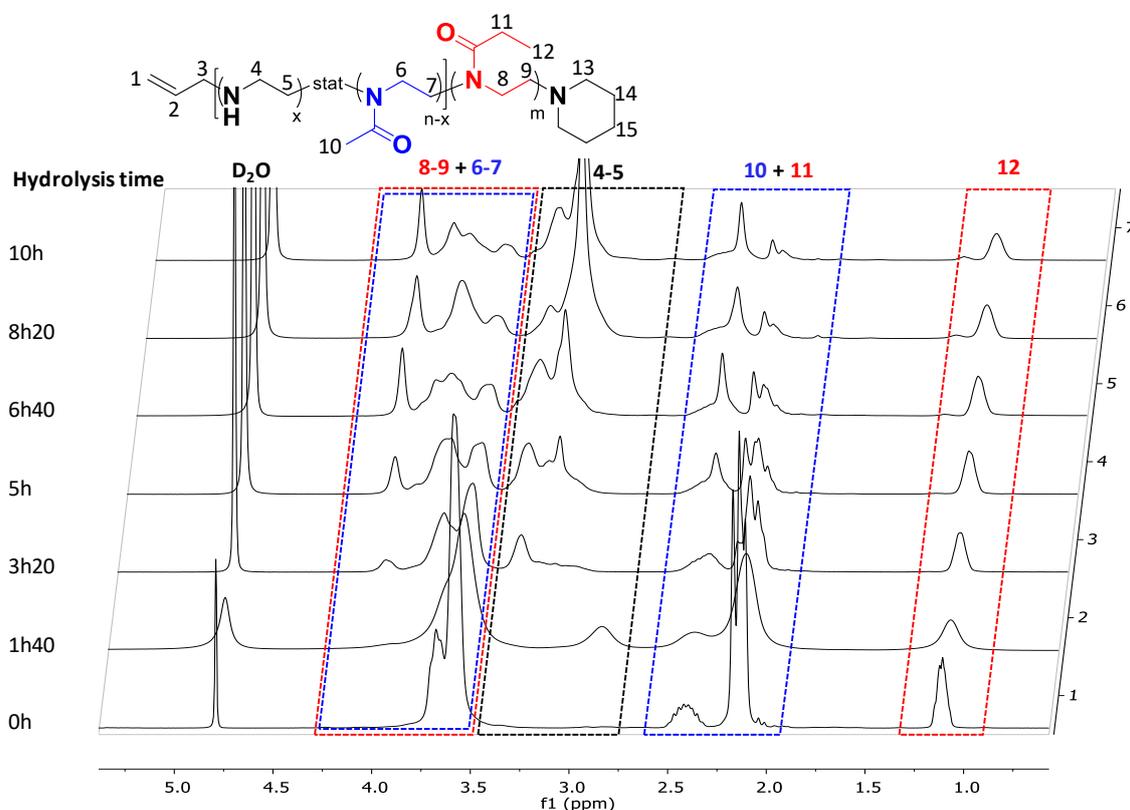


Figure II.23 : Superposition des spectres RMN ^1H du copolymère P_3 hydrolysé à différents temps de réaction (réaction $\text{H}_{\text{P}3-3}$).

Pour effectuer le calcul des taux d'hydrolyse ainsi que des masses molaires de chaque bloc, les pourcentages d'unités MeOx et EtOx dans le copolymère avant et pendant la réaction sont calculés. Les taux d'hydrolyse de chaque unité et l'hydrolyse totale sont ainsi obtenus pour chaque prélèvement (les détails des calculs sont donnés en **Annexe II.4**). Les résultats sont présentés sur la **Figure II.24.a**. La désacylation des deux types d'unités (MeOx et EtOx) est observée montrant que la micellisation des copolymères n'a pas lieu lors de l'étape de chauffage. Les deux blocs sont donc accessibles pendant l'hydrolyse, néanmoins, un degré d'hydrolyse plus élevé est observé pour les unités MeOx.

Pour les copolymères P_2 et P_3 , différents tests ont été réalisés en utilisant des conditions similaires à celles utilisées par Hoogenboom mais en modifiant les solvants et les temps de réaction. Une sélectivité apparaît pour quelques expériences, les unités MeOx étant plus hydrolysées que les unités EtOx. Afin de faciliter la comparaison des différents essais réalisés,

un graphique représentant le rapport entre le nombre d'unités MeOx hydrolysées et le nombre d'unités EtOx hydrolysées en fonction du taux d'hydrolyse de MeOx est présenté en **Figure II.24.b**. Sur ce graphique, un bon résultat correspond à un rapport d'hydrolyses MeOx/EtOx élevé combiné à un haut taux d'hydrolyse de MeOx (> 95 %).

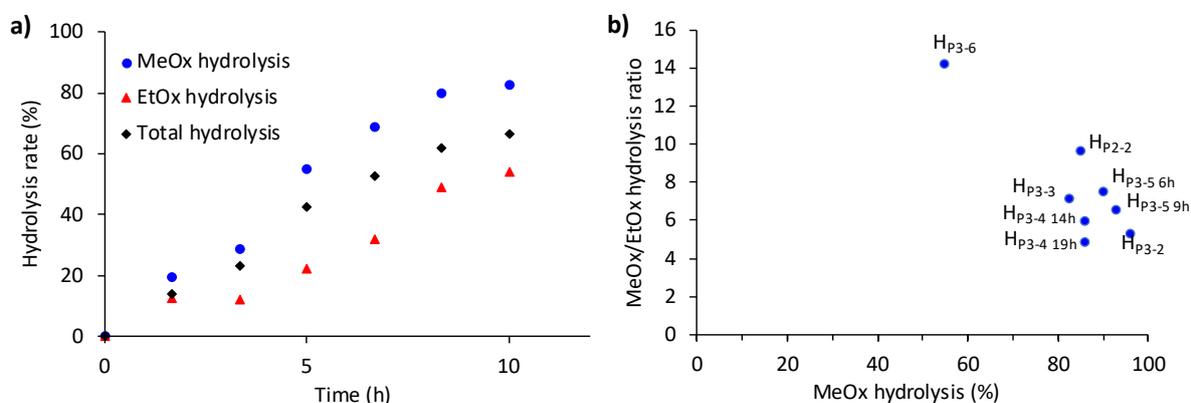


Figure II.24 : (a) Cinétique d'hydrolyse de la réaction HP₃₋₃ et (b) rapport d'hydrolyses MeOx/EtOx en fonction du degré d'hydrolyse de MeOx.

Ainsi, la meilleure sélectivité est observée pour l'expérience HP₃₋₆ réalisée dans un mélange 1,2-propanediol/H₂O (80/20 v/v) avec 6,6 équivalents d'acide par unité oxazoline puisque la sélectivité est de 14. Cela signifie que 14 unités MeOx sont hydrolysées pour une unité EtOx hydrolysée. Cependant, le degré d'hydrolyse de MeOx reste faible (55 %). Le spectre RMN de cette réaction HP₃₋₆ est présenté en **Annexe II.5**.

Pour quelques expériences, un taux d'hydrolyse proche de 100 % est obtenu, par exemple pour HP₃₋₁ et HP₃₋₂, mais la sélectivité diminue fortement, 4,5 et 5,2 respectivement, indiquant une hydrolyse des motifs EtOx élevée. L'expérience HP₃₋₅ réalisée dans une solution propanediol/H₂O (80/20 v/v) saturée en NaCl pendant 6 h donne des résultats intéressants. En effet, le degré d'hydrolyse de MeOx est assez élevé (> 90 %) et celui d'EtOx ne dépasse pas 55,7 %. HP₂₋₂ montre une sélectivité élevée, autour de 10, même si le taux d'hydrolyse de MeOx est plus faible que souhaité.

Pour conclure sur l'hydrolyse des copolymères PMeOx-*b*-PEtOx, une sélectivité partielle est observée puisque les unités MeOx sont plus hydrolysées que celles EtOx. Comparés aux résultats de Hoogenboom, une sélectivité légèrement plus élevée est obtenue avec un copolymère contenant un bloc PMeOx plus important et en réalisant la réaction d'hydrolyse dans un mélange 1,2-propanediol/H₂O (80/20 v/v). Ce meilleur résultat est probablement dû à l'utilisation d'un alcool plus hydrophobe.

III. Hydrolyse des copolymères poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-*b*-(2-méthyl-2-oxazoline)s

III.1. Thermosensibilité des copolymères PiPrOx-*b*-PMeOx

De la même façon que pour les copolymères PMeOx-*b*-PEtOx, la thermosensibilité des copolymères PiPrOx-*b*-PMeOx a été évaluée avant de réaliser les expériences d'hydrolyse. Les PiPrOx ayant une LCST autour de 40 °C, une température de transition de phase supérieure à 40 °C est attendue pour les copolymères. Une analyse par nano-DSC a été réalisée avec le copolymère P₆ en utilisant la même concentration que pour les réactions d'hydrolyse soit 0,48 mol.L⁻¹ en unités oxazoline. L'analyse met en évidence un signal à 55 °C suggérant la déplétion des molécules d'eau du bloc PiPrOx dans les micelles PiPrOx-*b*-PMeOx au-dessus de cette température (**Figure II.25**). Des copolymères thermosensibles ont donc été synthétisés.

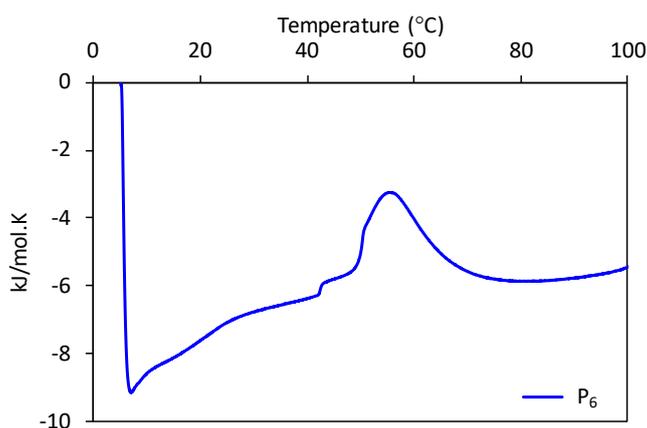


Figure II.25 : Analyse par nano-DSC du copolymère PiPrOx-*b*-PMeOx P₆ avec [unités Ox] = 0,48 M dans l'eau. Rampe de 5°C à 100 °C, vitesse 1 °C.min⁻¹.

III.2. Hydrolyse acide des copolymères PiPrOx-*b*-PMeOx

Grâce aux propriétés thermosensibles de ces copolymères, les réactions d'hydrolyse ont été étudiées dans le but d'obtenir une sélectivité complète de la réaction conduisant aux DHBCs PiPrOx-*b*-PEI cibles. Tout d'abord, les conditions opératoires préalablement optimisées pour les copolymères PMeOx-*b*-PEtOx ont été utilisées pour hydrolyser les copolymères PiPrOx-*b*-PMeOx, en particulier les conditions de H_{P2-2} ont été appliquées. Un mélange EtOH/H₂O (80/20 v/v) avec une concentration en unités oxazoline de 0,48 M et 6,6 équivalents d'HCl par unité Ox a donc été utilisé (**Schéma II.6**).

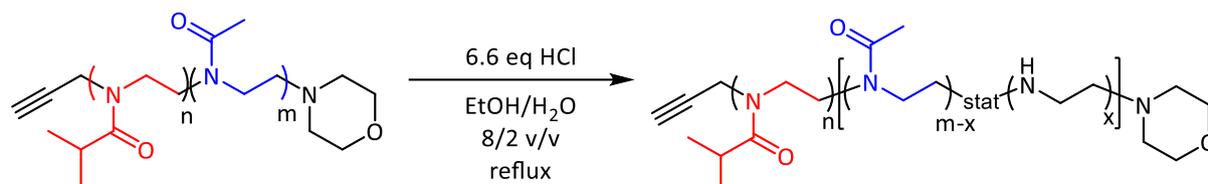


Schéma II.6 : Synthèse des copolymères PO_x-b-PEI.

Pour chaque copolymère, des prélèvements sont effectués au cours du temps pour suivre la réaction, sauf pour H_{P7} puisque P₆ et P₇ ont la même composition. Tous les prélèvements ont été purifiés par dialyse contre l'eau, séchés par lyophilisation et analysés. La **Figure II.26** présente la superposition des spectres RMN ¹H du copolymère P₆ hydrolysé à différents temps d'hydrolyse. Les signaux attribués aux unités éthylènimine dont l'intensité augmente avec le temps apparaissent dans la zone 2,7-3,4 ppm, parallèlement les signaux des protons méthyle des unités MeOx à 2,2 ppm diminuent. Le signal correspondant aux protons méthyle des unités iPrOx à 1,1 ppm ne change pratiquement pas.

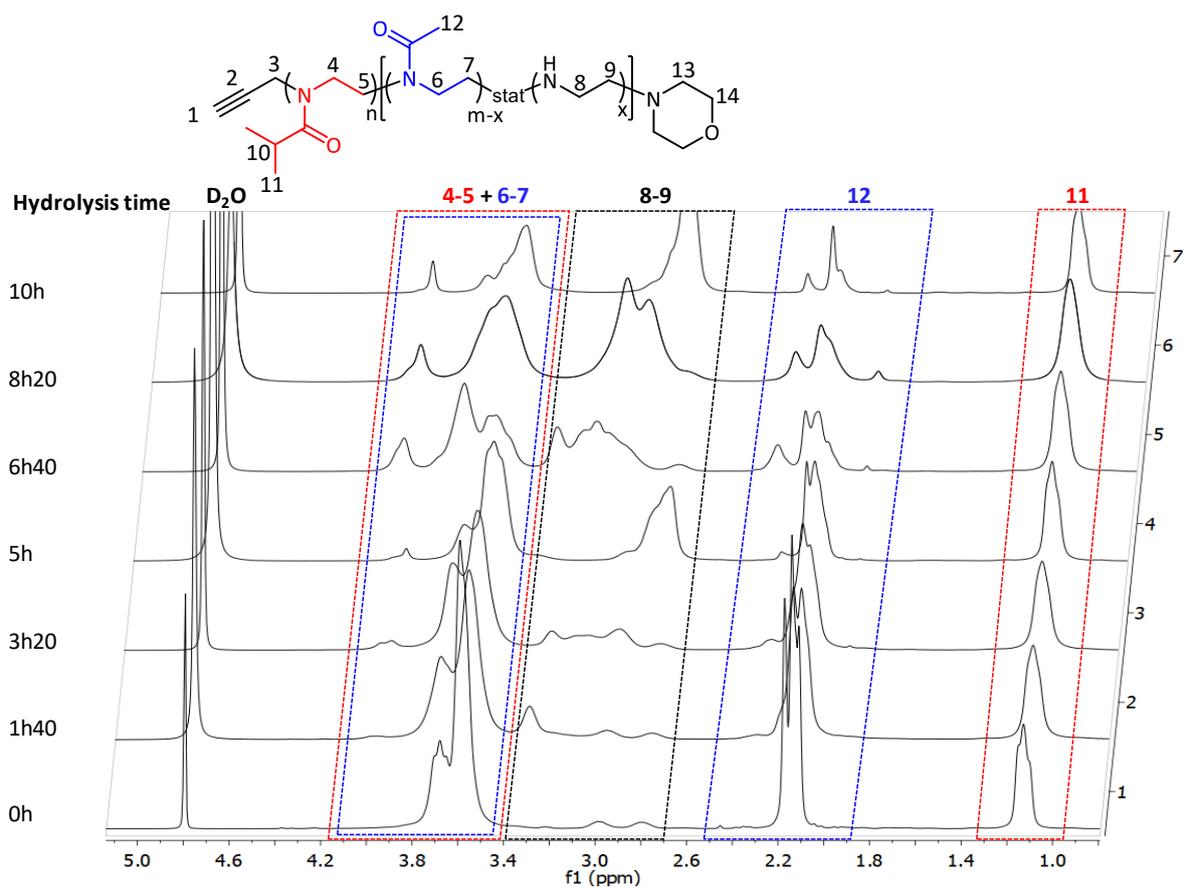


Figure II.26 : Superposition des spectres RMN ¹H du copolymère P₆ hydrolysé à différents temps de réaction (réaction H_{P6}).

Le taux d'hydrolyse de chaque unité ainsi que le taux d'hydrolyse total (MeOx + iPrOx) en fonction du temps ont été déterminés grâce aux pourcentages de chaque motif évalués avant

et pendant l'hydrolyse (les calculs sont détaillés en **Annexe II.6**). Les résultats sont reportés à la **Figure II.27**. Nous pouvons ainsi remarquer que très peu d'unités iPrOx sont hydrolysées alors que les unités MeOx sont hydrolysées jusqu'à 95,7 % après 16,5 h de réaction, soulignant une très grande sélectivité de la réaction. Le spectre RMN ^1H correspondant au dernier temps de réaction est présent en **Annexe II.7**. Toutes les expériences étudiées ($\text{H}_{\text{P}5}$ à $\text{H}_{\text{P}8}$) sont reportées dans le **Tableau II.10**. Les résultats indiqués dans le tableau correspondent aux temps d'hydrolyse conduisant à la meilleure sélectivité.

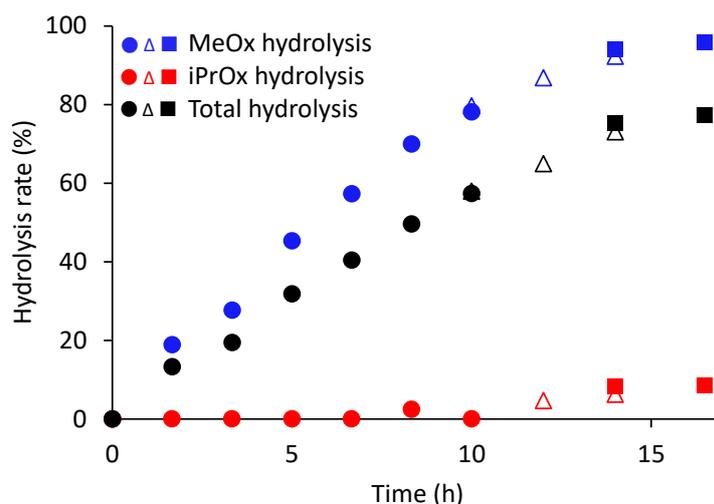


Figure II.27 : Cinétique d'hydrolyse de la réaction $\text{H}_{\text{P}6}$ (Expérience 1 de 0 à 10 h (●;●;●), expérience 2 de 10 h à 14 h (△;△;△), expérience 3 de 14 h à 16,5 h (■;■;■)).

Tableau II.10 : Synthèse des copolymères PiPrOx-*b*-PEI.

Run	Solvent	M_n before hydrolysis		Time h	Hydrolysis iPrOx %	Hydrolysis MeOx %	M_n after hydrolysis		
		PMeOx kg.mol^{-1}	PiPrOx kg.mol^{-1}				PiPrOx kg.mol^{-1}	PMeOx kg.mol^{-1}	PEI kg.mol^{-1}
$\text{H}_{\text{P}5}$	EtOH/ H_2O	18.8	7.0	14.5	14.5	97.8	6.0	0.4	9.5
$\text{H}_{\text{P}6}$	EtOH/ H_2O	14.2	7.0	16.5	8.4	95.7	6.4	0.6	7.2
$\text{H}_{\text{P}7}$	EtOH/ H_2O	14.6	6.8	16.5	3.0	94.6	6.6	0.8	7.1
$\text{H}_{\text{P}8}$	EtOH/ H_2O	10.3	7.3	10	4.8	89.0	7.0	1.0	4.7
$\text{H}_{\text{P}8-2}$	H_2O	10.3	7.0	10	81.8	97.8	1.3	0.2	7.1

Une sélectivité totale est observée pour toutes les expériences réalisées dans un mélange EtOH/ H_2O 80/20 v/v : l'hydrolyse des unités MeOx est supérieure à 95 % dans la plupart des expériences, avec un taux d'hydrolyse des unités iPrOx inférieur à 15 %. Ainsi, des DHBCs PiPrOx-*b*-PEI sont obtenus avec une quantité négligeable de résidus MeOx dans le bloc PEI. Les meilleurs résultats sont observés pour $\text{H}_{\text{P}7}$ pour lequel l'hydrolyse des MeOx est d'environ

95 % avec le plus faible taux d'hydrolyse des unités iPrOx (3 %). Pour confirmer l'importance du milieu réactionnel EtOH/H₂O, la même expérience est réalisée uniquement dans l'eau (HP₈₋₂). Le taux d'hydrolyse élevé de chaque bloc démontre l'importance de l'éthanol dans ces réactions.

Pour chaque expérience, le copolymère est mis en solution dans l'éthanol et chauffé à reflux, puis de l'HCl est ajouté donnant lieu à un mélange EtOH/H₂O 80/20 v/v. Dans le but de confirmer la micellisation des copolymères pendant cette procédure, des analyses par DLS ont été réalisées dans les mêmes conditions : tout d'abord dans l'éthanol puis dans le mélange de solvant (**Figure II.28**). Les solutions ne pouvant pas être chauffées à reflux pendant les analyses DLS, elles ont donc été analysées à 70 °C. La taille des objets mesurée dans l'éthanol à 70°C pour le copolymère P₆ a montré la présence d'unimères dans la solution. Cependant, lorsque l'analyse est effectuée avec le mélange de solvants utilisé pour l'hydrolyse (EtOH/H₂O 80/20 v/v + HCl), la formation d'agrégats est mise en évidence par l'augmentation de la taille des objets (de 4,4 nm à 13,4 nm en nombre).

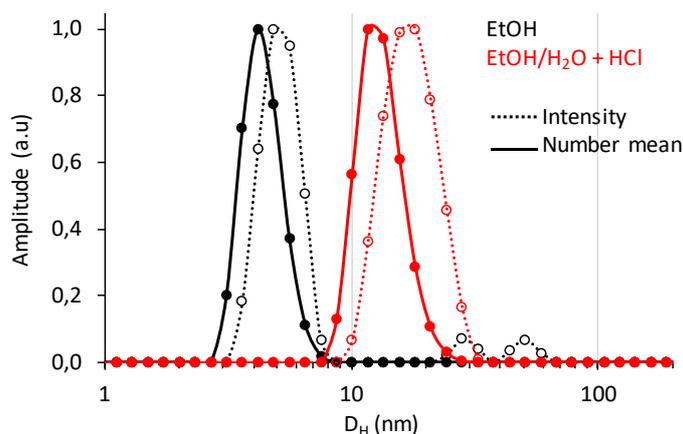


Figure II.28 : Tailles des objets mesurées par DLS en intensité et en nombre pour P₆ à 70 °C dans de l'éthanol ou dans un mélange EtOH/H₂O 80/20 v/v + HCl.

D'autre part, les cinétiques des hydrolyses HP₅ et HP₈ données en **Annexe II.8** indiquent que si l'hydrolyse est réalisée sur un temps trop long, les unités iPrOx peuvent être à leur tour désacétylées. Cette hydrolyse des unités iPrOx est d'autant plus importante que la quantité de MeOx est importante au départ. L'hypothèse est que la quantité croissante d'unités EI induit la destruction des micelles ou que la pénétration des molécules d'eau est facilitée, due à une augmentation de la solubilité des chaînes polymère comportant des unités EI à pH acide. Pour confirmer cette hypothèse, une analyse par nano-DSC a été réalisée sur les prélèvements à différents temps d'hydrolyse pour HP₆ (**Figure II.29**). Le signal de transition de phase en

fonction de la température diminue avec le taux d'hydrolyse et, à haut taux d'hydrolyse, aucune agrégation n'est observée même à haute température. Ainsi, la formation des blocs PEI mène à la destruction des micelles et donc à l'hydrolyse des unités iPrOx qui ne sont plus protégées dans le cœur de l'agrégat. Afin d'éviter cette hydrolyse non désirée, il est important d'arrêter l'hydrolyse à un temps précis, déterminé grâce à une étude cinétique : ce dernier correspond à un taux d'hydrolyse des unités MeOx élevé tout en conservant une hydrolyse faible des unités iPrOx.

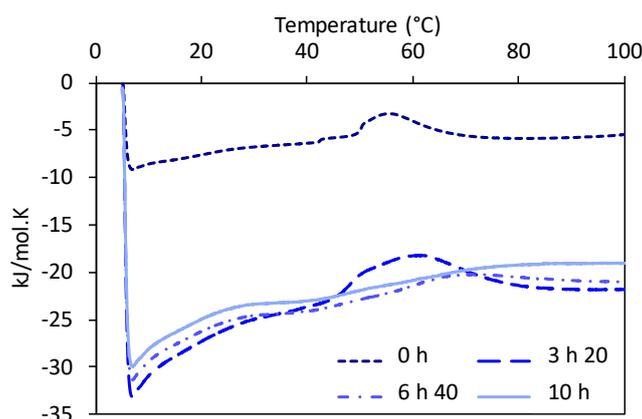


Figure II.29 : Température d'agrégation de HP_6 en fonction du temps d'hydrolyse ($[unité\ Ox] = 0,48\ M$; taux d'hydrolyse en MeOx obtenu après 3h20, 6h40 et 10h : 27,7 %, 57,3 % et 78,1 %).

Comme pour les copolymères POx, un copolymère hydrolysé a été caractérisé par RMN DOSY. Après 8h40 d'hydrolyse, un prélèvement de HP_6 a été purifié et analysé dans D_2O . Le temps d'hydrolyse est inférieur à celui reporté dans le **Tableau II.10**. Ce prélèvement présente une hydrolyse de 0 % et de 64 % respectivement pour les unités iPrOx et MeOx. Le spectre pseudo 2D (**Figure II.30**) permet d'affirmer que le squelette du polymère n'a pas été dégradé pendant la réaction d'hydrolyse puisque tous les signaux ont le même coefficient de diffusion ($D=(2,84\pm 0,06)\cdot 10^{-7}\ cm^2\cdot s^{-1}$), ainsi, seuls les groupes pendants sont éliminés pendant la réaction de désacétylation. L'écart type est, comme précédemment, faible, soulignant un produit homogène. Il est cependant complexe de comparer les coefficients de diffusion obtenus pour ce copolymère et son précurseur (P_6) puisque, après l'hydrolyse, les amines de la chaîne polymère sont partiellement protonées induisant une augmentation du volume hydrodynamique de la pelote statistique en solution. Cela peut expliquer pourquoi le coefficient de diffusion a diminué après la réaction alors que la masse molaire du polymère résultant a diminué.

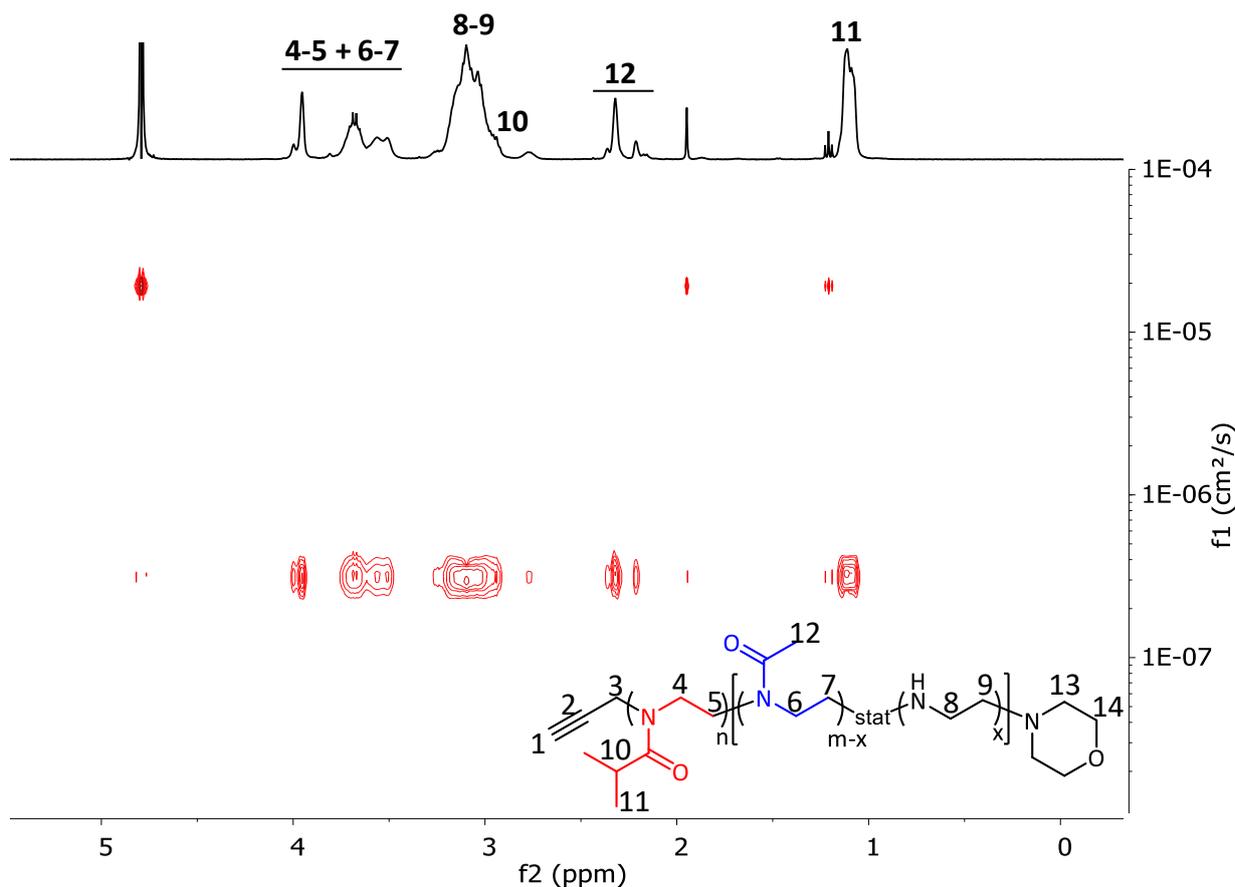


Figure II.30 : Spectre RMN DOSY du copolymère P₆ hydrolysé (temps d'hydrolyse = 8h40) dans D₂O à 25°C.

Un dernier paramètre important à étudier dans ce travail, est la reproductibilité de la réaction d'hydrolyse. Pour l'hydrolyse du copolymère P₆, trois expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions et reportées dans la **Figure II.27** : pour la première expérience, les prélèvements ont été réalisés entre 0 et 10h, pour la deuxième, entre 10h et 14h et pour la dernière, entre 14h et 16h30. La continuité de chaque courbe et les taux d'hydrolyse très proches obtenus à un même temps t témoignent de la reproductibilité de la réaction. En outre, les hydrolyses des copolymères P₆ et P₇ dont les compositions sont similaires ont donné des taux d'hydrolyse proches après un même temps de réaction.

Conclusion

Dans ce chapitre, deux types de copolymères $PO_{x1}-b-PO_{x2}$ ont été étudiés dans le but de synthétiser des DHBCs $PO_x-b-PEI$ avec un bloc PO_x hydrophile à la température corporelle.

Tout d'abord, des homopolymères ont été synthétisés afin d'optimiser les conditions de réaction pour la synthèse des copolymères à blocs. Puis, les copolymères $PMeO_x-b-PEtO_x$ et les copolymères $PiPrO_x-b-PMeO_x$ avec différents ratios MeO_x/EtO_x ou $iPrO_x/MeO_x$ ont été synthétisés. En se basant sur les LCST des homopolymères $PEtO_x$ et $PiPrO_x$, des copolymères thermosensibles étaient attendus.

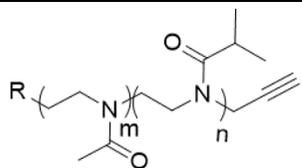
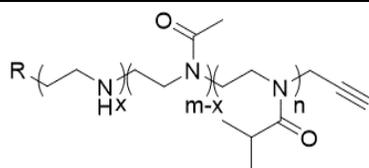
Dans le cas des $PMeO_x-b-PEtO_x$, aucune agrégation n'a été observée par nano-DSC même pour le copolymère comportant le bloc $PEtO_x$ de plus haute masse molaire. Les expériences d'hydrolyse ont montré une sélectivité en faveur de l'hydrolyse des unités MeO_x en comparaison des unités EtO_x mais non suffisante pour l'application visée.

Les copolymères $PiPrO_x-b-PMeO_x$ comportant un co-monomère plus hydrophobe que EtO_x ont, quant à eux, montré une thermosensibilité. Ainsi, cette propriété a permis l'hydrolyse totalement sélective des copolymères et des DHBCs $PiPrO_x-b-PEI$ ont été obtenus. Ces copolymères solubles à la température corporelle sont donc de potentiels nouveaux vecteurs pour la thérapie génique.

D'autre part, l'hydrolyse des homopolymères $PMeO_x$ a été réalisée afin d'obtenir des PEI témoins des $PiPrO_x-b-PEI$ en termes de masse molaire. Une comparaison des copolymères $PiPrO_x-b-PEI$ et des homopolymères PEI pourra alors être effectuée dans le chapitre IV.

Dans la suite de ce manuscrit, nous travaillerons donc essentiellement avec les copolymères $PiPrO_x-b-PMeO_x$ et $PiPrO_x-b-PEI$ (P_x et H_{P_x} respectivement) et leurs homologues témoins $PMeO_x$ et PEI nommés T_{P_x} et $T_{H_{P_x}}$ respectivement. Différents numéros de lots ont été réalisés pour chacun de ces polymères, ainsi, dans le but de simplifier la compréhension, le **Tableau II.11** récapitule les différents lots ainsi que leurs caractéristiques.

Tableau II.11 : Caractéristiques des différents homopolymères et copolymères utilisés dans la suite du manuscrit.

											
PMeOx- <i>b</i> -PiPrOx				PEI- <i>b</i> -PiPrOx							
Copolymers	Type	Batch	M_n^{th} (kg/mol) (PMeOx-PiPrOx)	$M_n^{SEC DMF}$ (kg/mol) (PMeOx-PiPrOx)	Type	Batch	M_n^{th} (kg/mol) (PEI-PiPrOx)	M_n^* (kg/mol) PEI-PMeOx-PiPrOx	% hydrolysis (MeOx/iPrOx)		
	P ₅	GwD-83	30-6	19.0 + 7.0	HP ₅	GwD-95 _{P6}	15-6	9.5 + 0.4 + 6.0	97.8/14.5		
		SAK-1				SAK-4				8.6 + 2.0 + 6.9	89/0
				GwD-151		9.0 + 1.7 + 6.6				90/4.4	
	P ₆	GwD-68	20-6	14.2 + 7.0	HP ₆	GwD-82 _{P2}	10-6	6.9 + 0.6 + 6.4	95.7/8.4		
		GwD-85				GwD-92				6.9 + 0.8 + 6.6	94.6/3
		GwD-99				SAK-2				6.8 + 0.8 + 7.2	94.3/0
		GwD-118				SAK-7				6.6 + 1 + 7.2	93.3/0
SH-01		GwD-121				6.8 + 1.2 + 7.3				92/0	
P ₈	SAK-5	10-6	8.3 + 7.0	HP ₈	SAK-8	5-6	3.5 + 1.3 + 6.5	84.5/5.3			
	GwD-89				GwD-96 _{P8}				4.6 + 1.0 + 6.9	89/4.8	
					GwD-98				4.2 + 1.2 + 6.5	86/5.1	

		PMeOx				PEI			
Homopolymers	Type	Batch	M_n^{th} (kg/mol)	$M_n^{SEC DMF}$ (kg/mol)	Type	Batch	M_n^{th} (kg/mol)	M_n^* (kg/mol)	% hydrolysis
	T _{P5}	GwD-84	30	21.5	T _{HP5}	GwD-132	15	11.0	96.2
		GwD-153				GwD-158			
	T _{P6}	GwD-133	20	16.9	T _{HP6}	GwD-137	10	8.2	95.6
		GwD-157				GwD-160			
	T _{P8}	GwD-134	10	8.8	T _{HP8}	GwD-138	5	4.7	94.8
GwD-143-bis						4.7			

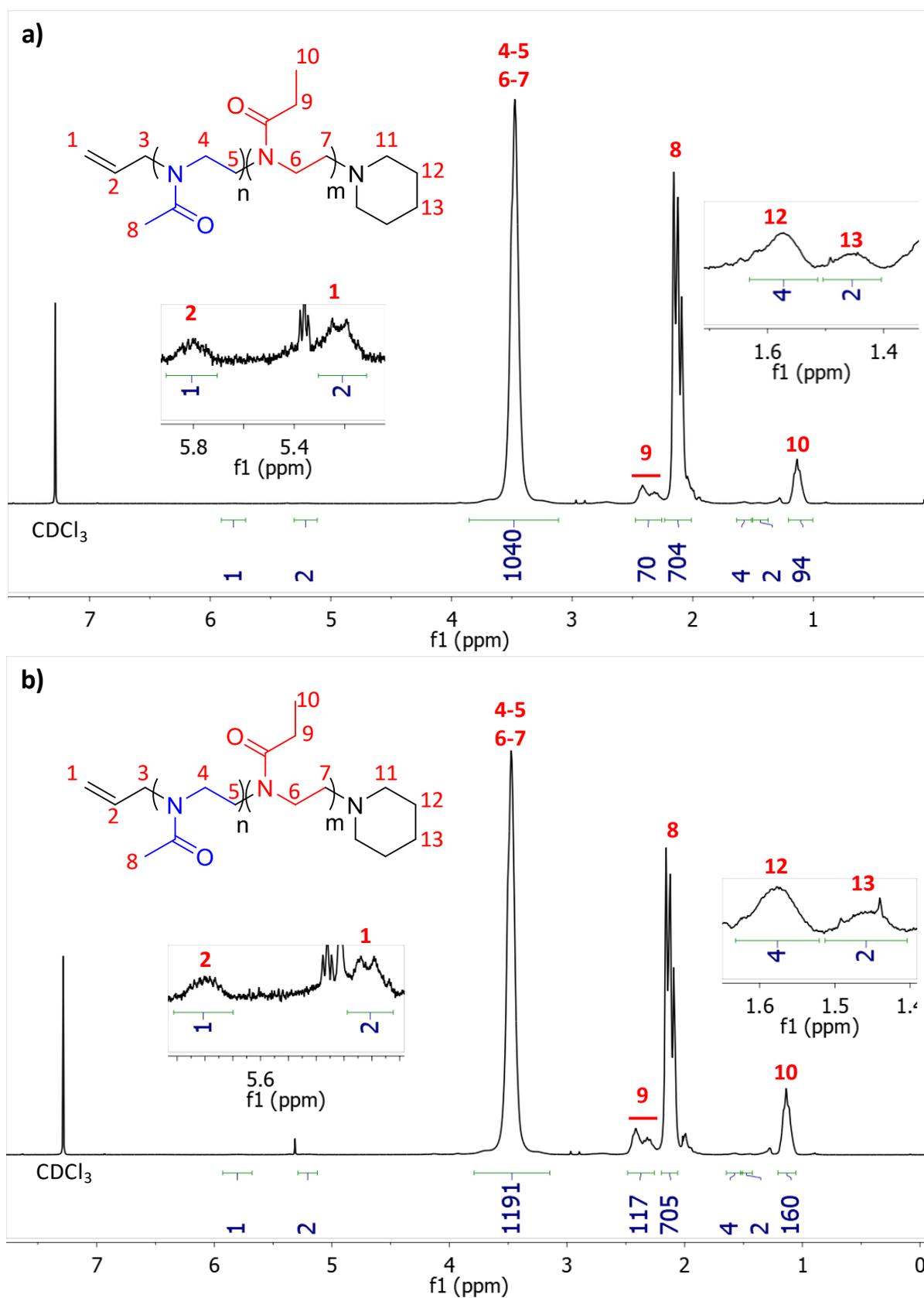
*: M_n calculated from SEC values and hydrolysis rate. Each values of molar masses correspond to each bloc. T_{Px}: witness of P_x polymers, T_{HPx}: witness of H_{Px} polymers

Références

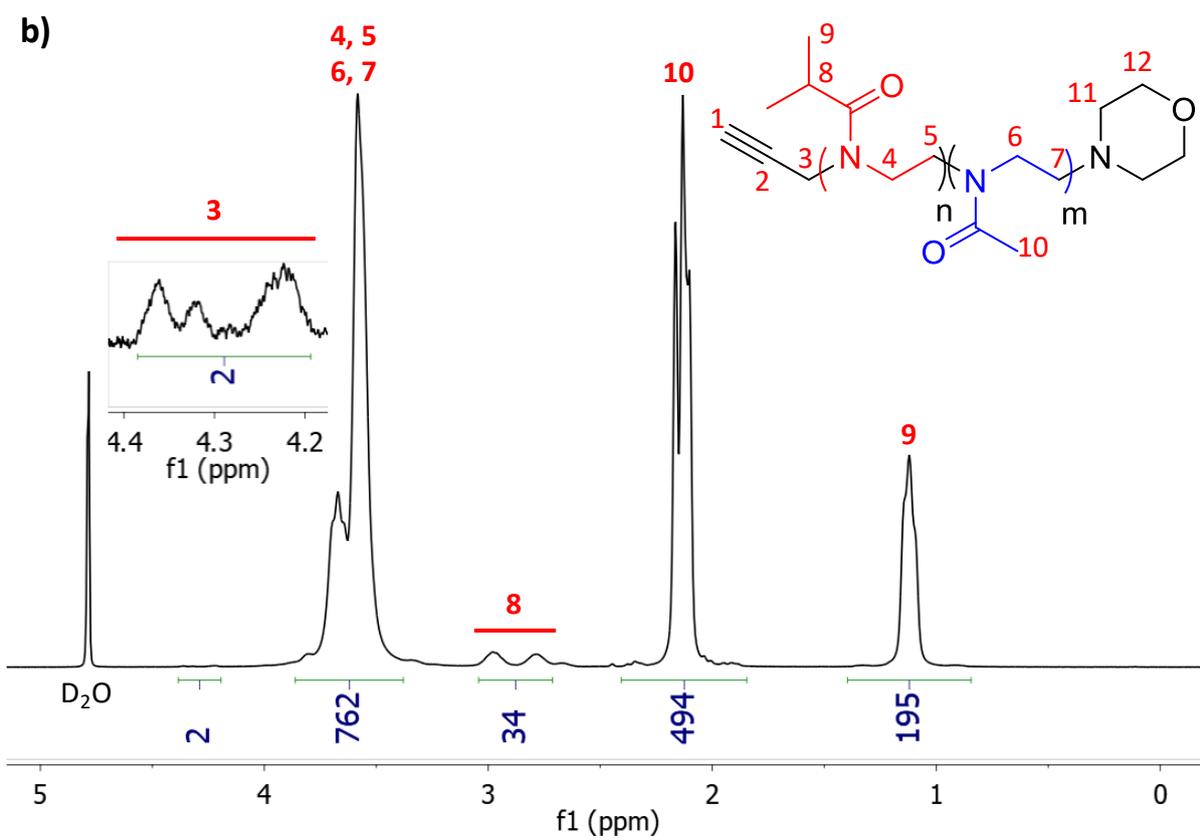
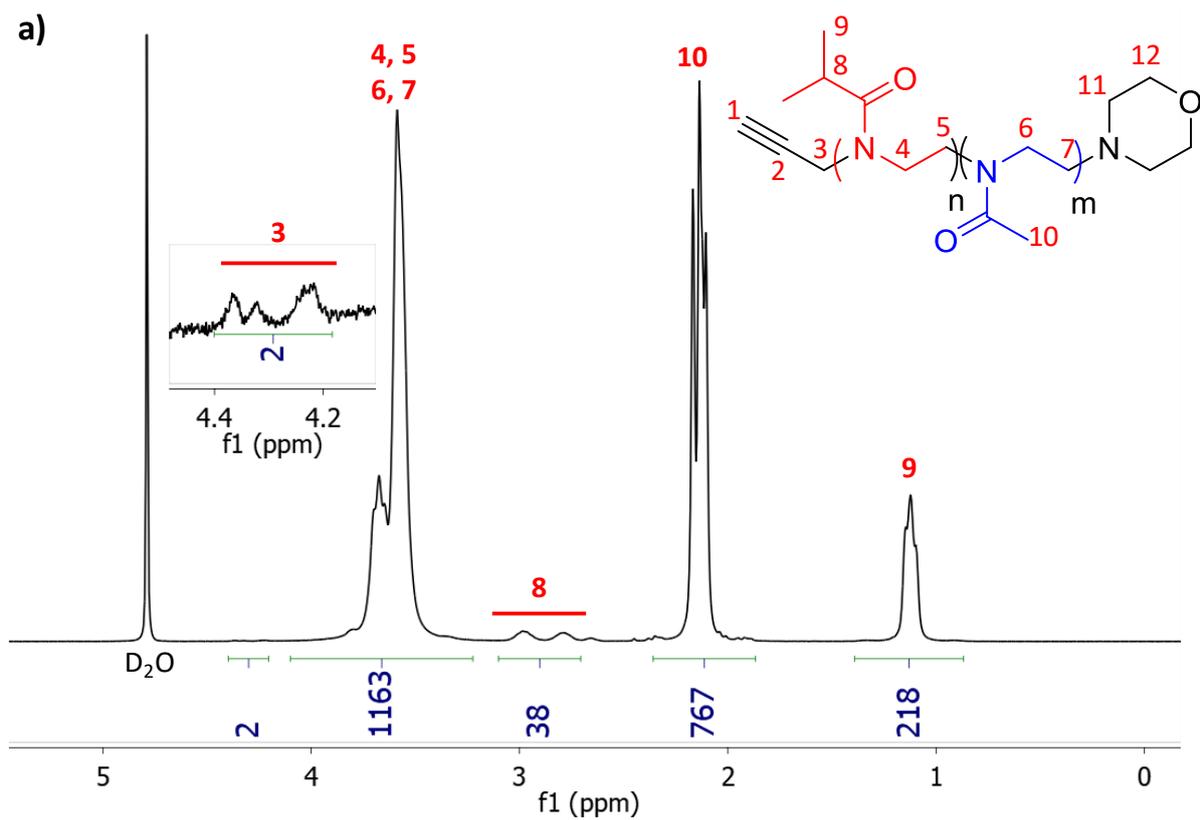
- (1) Hoogenboom, R. Poly(2-Oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications. *Angew. Chem. Int. Edit* **2009**, *48* (43), 7978–7994. <https://doi.org/10.1002/anie.200901607>.
- (2) Sedlacek, O.; Monnery, B. D.; Filippov, S. K.; Hoogenboom, R.; Hruby, M. Poly(2-Oxazoline)s – Are They More Advantageous for Biomedical Applications Than Other Polymers? *Macromol. Rapid Commun* **2012**, *33* (19), 1648–1662. <https://doi.org/10.1002/marc.201200453>.
- (3) Lambermont-Thijs, H. M. L.; van der Woerd, F. S.; Baumgaertel, A.; Bonami, L.; Du Prez, F. E.; Schubert, U. S.; Hoogenboom, R. Linear Poly(Ethylene Imine)s by Acidic Hydrolysis of Poly(2-Oxazoline)s: Kinetic Screening, Thermal Properties, and Temperature-Induced Solubility Transitions. *Macromolecules* **2010**, *43* (2), 927–933. <https://doi.org/10.1021/ma9020455>.
- (4) Brissault, B.; Kichler, A.; Guis, C.; Leborgne, C.; Danos, O.; Cheradame, H. Synthesis of Linear Polyethylenimine Derivatives for DNA Transfection. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14* (3), 581–587. <https://doi.org/10.1021/bc0200529>.
- (5) Kuringen, H. P. C. V.; Lenoir, J.; Adriaens, E.; Bender, J.; Geest, B. G. D.; Hoogenboom, R. Partial Hydrolysis of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) and Potential Implications for Biomedical Applications? *Macromol. Biosci.* **2012**, *12* (8), 1114–1123. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200080>.
- (6) de la Rosa, V. R.; Bauwens, E.; Monnery, B. D.; De Geest, B. G.; Hoogenboom, R. Fast and Accurate Partial Hydrolysis of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) into Tailored Linear Polyethylenimine Copolymers. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (17), 4957–4964. <https://doi.org/10.1039/C4PY00355A>.
- (7) van Kuringen, H. P. C.; de la Rosa, V. R.; Fijten, M. W. M.; Heuts, J. P. A.; Hoogenboom, R. Enhanced Selectivity for the Hydrolysis of Block Copoly(2-Oxazoline)s in Ethanol-Water Resulting in Linear Poly(Ethylene Imine) Copolymers. *Macromol. Rapid Commun* **2012**, *33* (9), 827–832. <https://doi.org/10.1002/marc.201200046>.
- (8) Hsiue, G.-H.; Chiang, H.-Z.; Wang, C.-H.; Juang, T.-M. Nonviral Gene Carriers Based on Diblock Copolymers of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) and Linear Polyethylenimine. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17* (3), 781–786. <https://doi.org/10.1021/bc050317u>.
- (9) Aoi, K.; Okada, M. Polymerization of Oxazolines. *Prog. Polym. Sci* **1996**, *21* (1), 151–208.
- (10) Plet, L.; Delecourt, G.; Hanafi, M.; Pantoustier, N.; Pembouong, G.; Midoux, P.; Bennevault, V.; Guégan, P. Controlled Star Poly(2-Oxazoline)s: Synthesis, Characterization. *Eur. Polym. J* **2020**, *122*, 109323. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109323>.
- (11) Wiesbrock, F.; Hoogenboom, R.; Leenen, M. A. M.; Meier, M. A. R.; Schubert, U. S. Investigation of the Living Cationic Ring-Opening Polymerization of 2-Methyl-, 2-Ethyl-, 2-Nonyl-, and 2-Phenyl-2-Oxazoline in a Single-Mode Microwave Reactor. *Macromolecules* **2005**, *38* (12), 5025–5034. <https://doi.org/10.1021/ma0474170>.
- (12) Pooch, F.; Telteviskiy, V.; Karjalainen, E.; Tenhu, H.; Winnik, F. M. Poly(2-Propyl-2-Oxazoline)s in Aqueous Methanol: To Dissolve or Not to Dissolve. *Macromolecules* **2019**, *52* (17), 6361–6368. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b01234>.
- (13) Park, J.-S.; Kataoka, K. Precise Control of Lower Critical Solution Temperature of Thermosensitive Poly(2-Isopropyl-2-Oxazoline) via Gradient Copolymerization with 2-

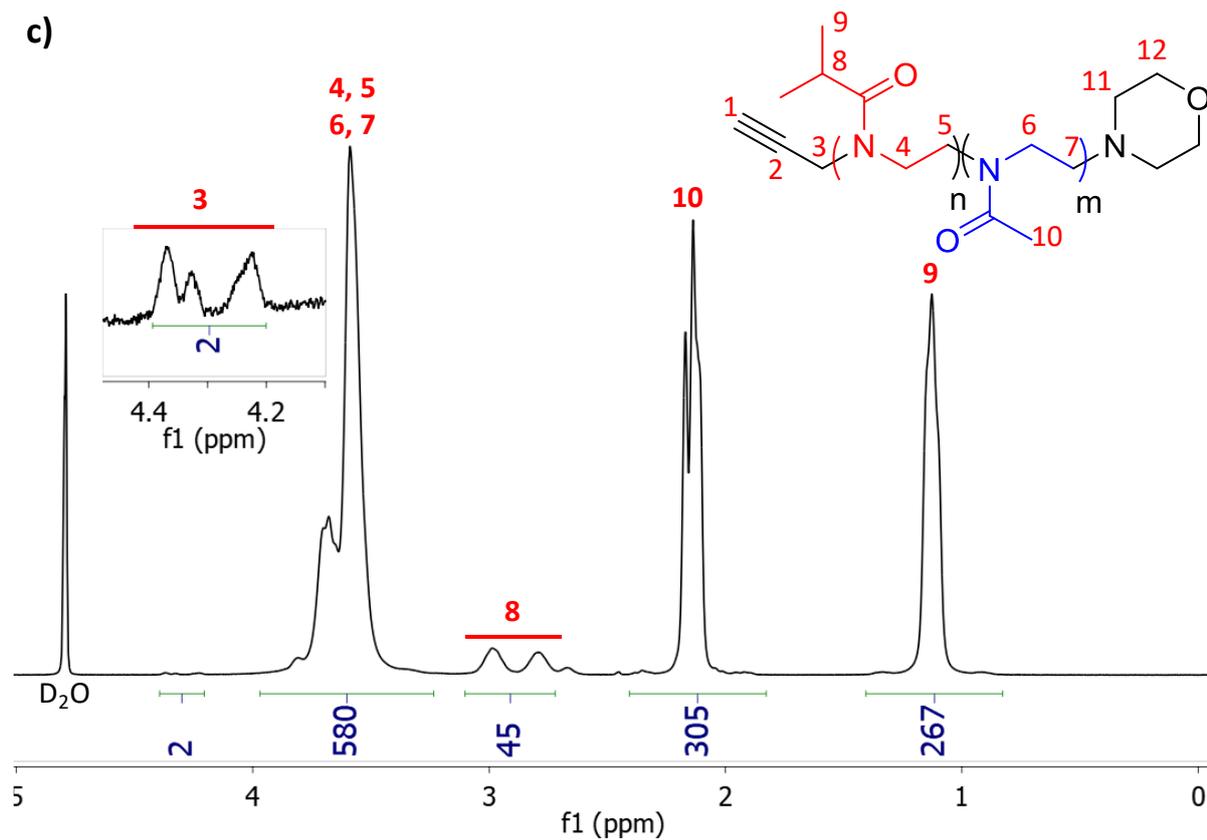
- Ethyl-2-Oxazoline as a Hydrophilic Comonomer. *Macromolecules* **2006**, *39* (19), 6622–6630. <https://doi.org/10.1021/ma0605548>.
- (14) Kobayashi, S. 4.15 - Polymerization of Oxazolines. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference*; Matyjaszewski, K., Möller, M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2012; pp 397–426. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00110-2>.
- (15) Tanaka, R.; Ueoka, I.; Takaki, Y.; Kataoka, K.; Saito, S. High Molecular Weight Linear Polyethylenimine and Poly(N-Methylethylenimine). *Macromolecules* **1983**, *16* (6), 849–853. <https://doi.org/10.1021/ma00240a003>.
- (16) Plet, L. Synthèse de nouveaux vecteurs cationiques à architecture en étoile pour le transfert de gènes <http://www.theses.fr/s243201> (accessed Jul 29, 2020).
- (17) Bertrand, E.; Gonçalves, C.; Billiet, L.; Gomez, J. P.; Pichon, C.; Cheradame, H.; Midoux, P.; Guégan, P. Histidinylated Linear PEI: A New Efficient Non-Toxic Polymer for Gene Transfer. *Chem. Commun. (Camb.)* **2011**, *47* (46), 12547–12549. <https://doi.org/10.1039/c1cc15716g>.
- (18) Cortez, M. A.; Godbey, W. T.; Fang, Y.; Payne, M. E.; Cafferty, B. J.; Kosakowska, K. A.; Grayson, S. M. The Synthesis of Cyclic Poly(Ethylene Imine) and Exact Linear Analogues: An Evaluation of Gene Delivery Comparing Polymer Architectures. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (20), 6541–6549. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b00980>.

Annexes



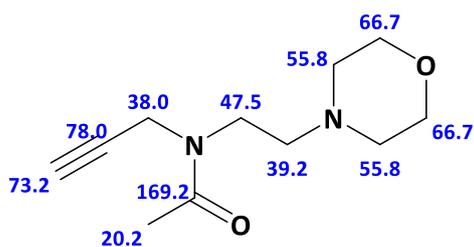
Annexe II.1 : Spectres RMN ^1H des copolymères $\text{PMeOx-}b\text{-PEtOx}$ (a) P_2 et (b) P_3 dans CDCl_3 à 20°C .



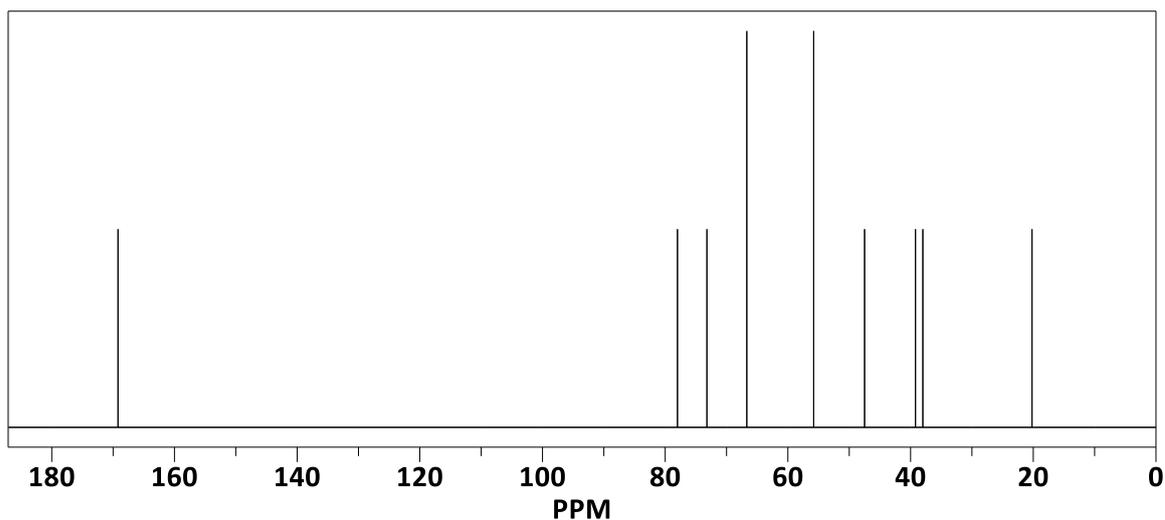


Annexe II.2 : Spectres RMN ^1H des copolymères PiPrOx-*b*-PMeOx (a) P₅, (b) P₇ et (c) P₈ dans CDCl_3 à 20 °C.

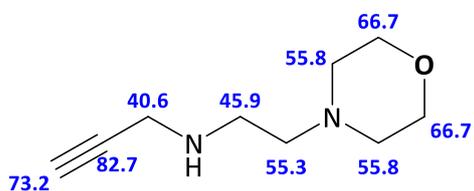
a) ChemNMR ^{13}C Estimation



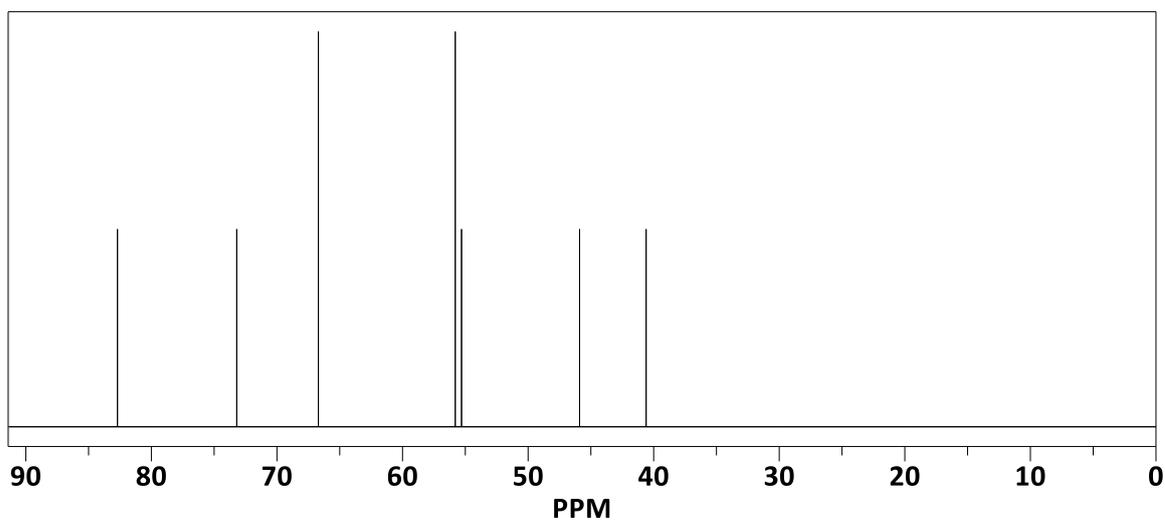
Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough



b) ChemNMR ^{13}C Estimation



Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough



Annexe II.3 : Simulations RMN ^{13}C de (a) GwD-134 et (b) GwD-138.

Annexe II.4 : Calcul des taux d'hydrolyse des copolymères PMeOx-*b*-PEtOx.

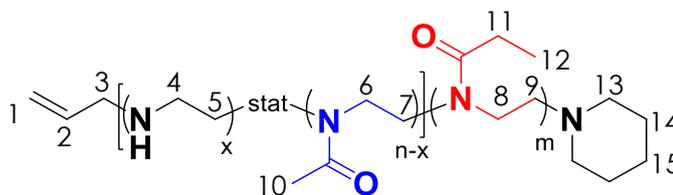
The MeOx hydrolysis degree (H_{MeOx}) is defined as the change in the percentage of MeOx units divided by the initial percentage, the percentages being determined from ^1H NMR spectra of the precursor copolymer and the resulting hydrolyzed copolymer.

$$H_{\text{MeOx}} = \frac{\text{initial MeOx units \%} - \text{remaining MeOx unit \%}}{\text{initial MeOx units \%}}$$

$$\text{with initial MeOx units \%} = \frac{\frac{I_{10}}{3}}{\frac{I_{6,7,8,9}}{4}}$$

$$\text{remaining MeOx units \%} = \frac{\frac{I_{10} + I_{11} - 2 \times I_{12}}{3}}{\frac{I_{4,5} + I_{6,7,8,9}}{4}}$$

I_y is the intensity of the proton y according the following assignment:



Similarly, the EtOx hydrolysis degree (H_{EtOx}) is defined as the change in the percentage of EtOx units divided by the initial percentage.

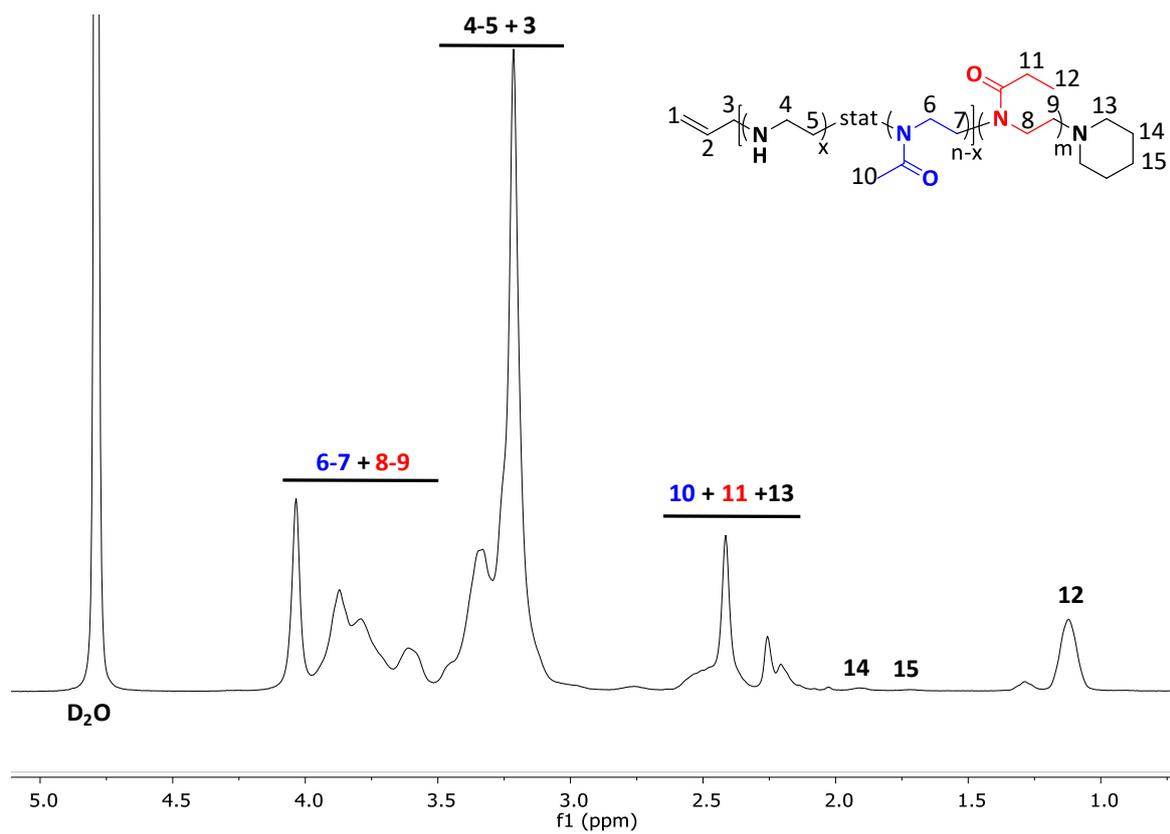
$$H_{\text{EtOx}} = \frac{\text{initial EtOx units \%} - \text{remaining EtOx unit \%}}{\text{initial EtOx units \%}}$$

$$\text{with initial EtOx units \%} = \frac{\frac{I_{12}}{3}}{\frac{I_{6,7,8,9}}{4}}$$

$$\text{remaining EtOx units \%} = \frac{\frac{I_{12}}{3}}{\frac{I_{4,5} + I_{6,7,8,9}}{4}}$$

At last, the total hydrolysis degree ($H_{\text{EtOx} + \text{MeOx}}$) corresponds to the percentage of hydrolyzed MeOx and EtOx units. It was calculated as follows:

$$H_{\text{EtOx} + \text{MeOx}} = \frac{I_{4,5}}{I_{4,5} + I_{6,7,8,9}}$$



Annexe II.5 : Spectre RMN ^1H de HP_{3-6} dans du D_2O .

Annexe II.6 : Calcul des taux d'hydrolyse des copolymères PiPrOx-*b*-PMeOx.

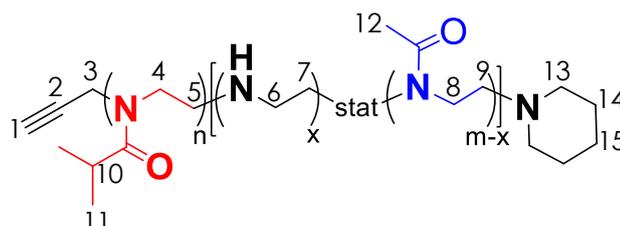
The iPrOx hydrolysis degree (H_{iPrOx}) is defined as the change in the percentage of iPrOx units divided by the initial percentage, the percentages being determined from 1H NMR spectra of the precursor copolymer and the resulting hydrolyzed copolymer.

$$H_{iPrOx} = \frac{\text{initial iPrOx units \%} - \text{remaining iPrOx unit \%}}{\text{initial iPrOx units \%}}$$

$$\text{with initial iPrOx units \%} = \frac{\frac{I_{11}}{6}}{\frac{I_{4,5,8,9}}{4}}$$

$$\text{remaining iPrOx units \%} = \frac{\frac{I_{11}}{6}}{\frac{I_{6,7} + I_{4,5,8,9} - \frac{I_{11}}{6}}{4}}$$

I_y is the intensity of the proton y according the following assignment:



Similarly, the MeOx hydrolysis degree (H_{MeOx}) is defined as the change in the percentage of MeOx units divided by the initial percentage.

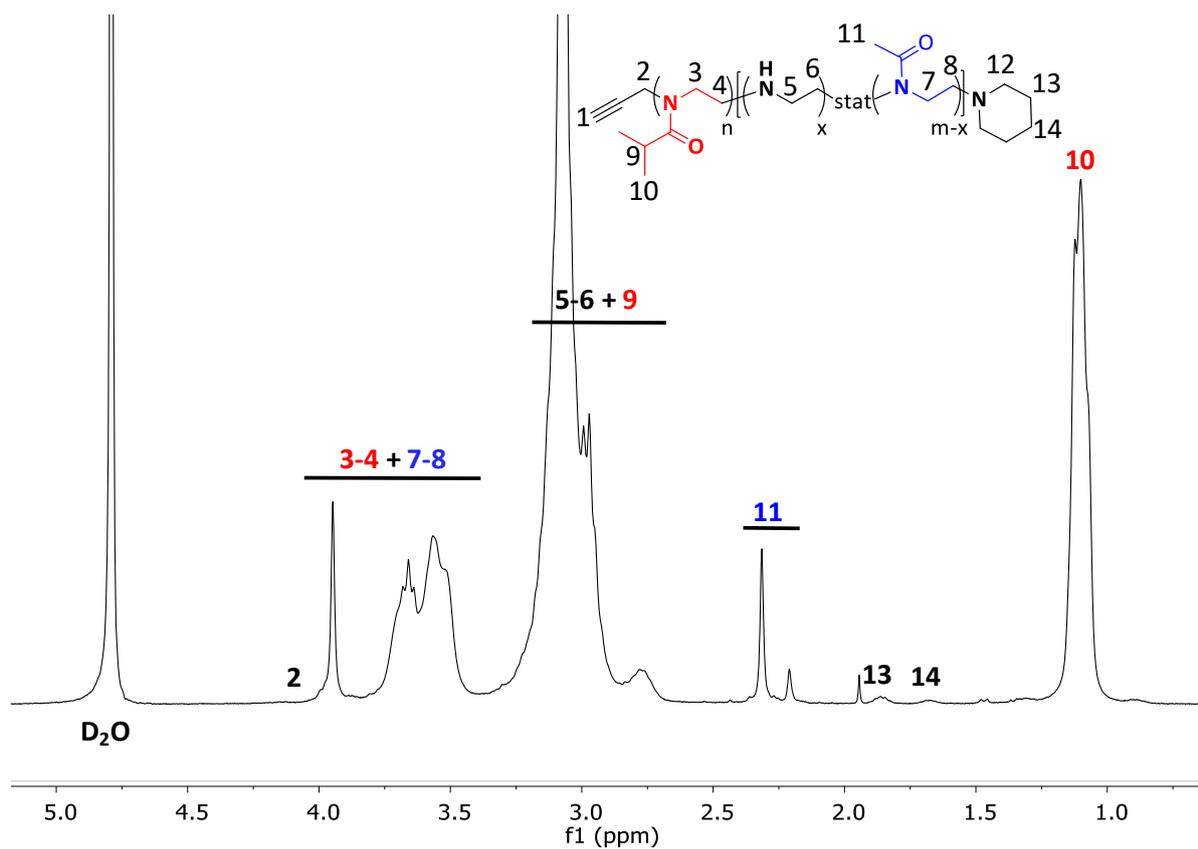
$$H_{MeOx} = \frac{\text{initial MeOx units \%} - \text{remaining MeOx unit \%}}{\text{initial MeOx units \%}}$$

$$\text{with initial MeOx units \%} = \frac{\frac{I_{12}}{3}}{\frac{I_{4,5,8,9}}{4}}$$

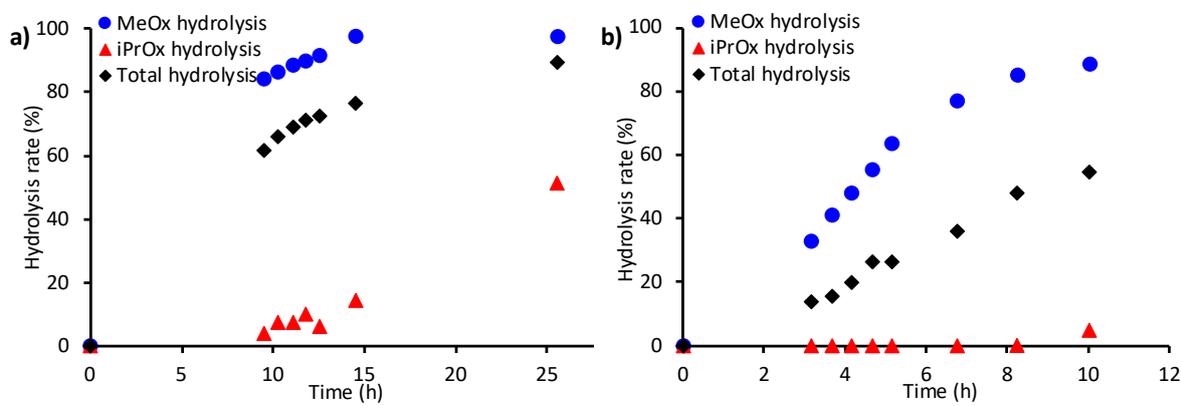
$$\text{remaining MeOx units \%} = \frac{\frac{I_{12}}{3}}{\frac{I_{6,7} + I_{4,5,8,9} - \frac{I_{11}}{6}}{4}}$$

At last, the total hydrolysis degree ($H_{iPrOx + MeOx}$) corresponds to the percentage of hydrolyzed iPrOx and MeOx units. It was calculated as follows:

$$H_{iPrOx + MeOx} = \frac{I_{6,7} - \frac{I_{11}}{6}}{I_{6,7} + I_{4,5,8,9} - \frac{I_{11}}{6}}$$



Annexe II.7 : Spectre RMN ¹H de HP₆ dans du D₂O à 20 °C.



Annexe II.8 : Cinétique des hydrolyses (a) HP₅ et (b) HP₈.

CHAPITRE 3

Fonctionnalisation des vecteurs

PEI et PiPrOx-*b*-PEI

Sommaire

Introduction	167
Partie I. Fonctionnalisation des motifs éthylènimine	169
I. Synthèse de la L-histidine-N-acryloyle (HNA)	169
II. Modification des polymères à base de PEI par la HNA	172
II.1. Fonctionnalisation des <i>l</i> PEI	172
II.2. Fonctionnalisation des PEI- <i>b</i> -PiPrOx	175
II.2.a. Etude du pH	177
II.2.b. Etude en température	177
II.2.c. Etude du solvant	179
Partie II. Fonctionnalisation des extrémités de chaîne	181
I. Fonctionnalisation par le galactose	181
I.1. Modification de la PiPrOx	183
I.2. Modification des PiPrOx- <i>b</i> -PEI	187
II. Fonctionnalisation par le dansyle	189
II.1. Synthèse de polymères fluorescents	189
II.1. Caractérisation des polymères fluorescents par spectroscopie	196
II.1.a. Spectroscopie UV des polymères	196
II.1.b. Spectroscopie de fluorescence des polymères	197
Conclusion	199
Références	200
Annexes	202

Introduction

Aujourd'hui, dans le but d'améliorer les nanomédicaments à base de polymères, l'introduction de nouvelles fonctionnalités sur les chaînes macromoléculaires est le sujet de nombreuses recherches afin d'obtenir des plateformes polyvalentes de polymères. Les polyéthylènimines et les poly(oxazoline)s permettent de multiples fonctionnalisations.¹⁻³ Comme présenté dans le chapitre bibliographique, diverses modifications sont possibles tant au niveau de leurs natures, de leurs lieux de greffage ou encore des réactions chimiques mises en œuvre.

En fonction de la nature de la molécule greffée, ces fonctionnalisations ont divers objectifs : une molécule biologique permettra une amélioration d'un des paramètres clés du transfert de gènes alors qu'un fluorophore, par exemple, permettra un suivi *in vitro* et/ou *in vivo* des polyplexes. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à la fonctionnalisation des polymères PEI et PEI-*b*-PiPrOx par ces deux types de fonctionnalisation par greffage covalent. Selon les approches classiques de chimie des polymères, la fonctionnalisation peut se faire de façon téléchélique, sur une extrémité de chaîne ou les deux, ou sur les unités de répétition de la chaîne macromoléculaire. Dans ce travail, les deux approches seront utilisées pour améliorer les propriétés de transfection des polymères synthétisés.

Tout d'abord, la modification des motifs éthylènimine par l'histidine sera étudiée. Pour rappel, Bertrand et *al.*⁴ ont démontré, en 2011, l'apport d'une fonctionnalisation par des motifs histidines *via* une addition de Michael. Cette fonctionnalisation améliore le relargage des polyplexes de l'endosome dans le cytosol grâce à l'augmentation de l'effet « éponge à protons ». Cet effet s'accompagne d'une diminution de la cytotoxicité.

D'autre part, les extrémités de chaînes fonctionnelles des polymères synthétisés au chapitre 2 sont des points d'accroche stratégiques pour la fonctionnalisation des polymères par utilisation d'une chimie orthogonale. Plusieurs travaux ont indiqué l'intérêt de cette stratégie de modification pour fixer un agent de ciblage cellulaire. Une localisation en fin de chaîne hydrophile des ligands leur confère une grande disponibilité pour interagir avec les parois des membranes cellulaires et améliorer l'internalisation cellulaire et donc l'efficacité de transfection.⁵ Dans notre étude, le ciblage de cellules pulmonaires ou hépatiques sera développé par la fonctionnalisation des extrémités de chaîne par du galactose. La fonctionnalisation sera réalisée sur l'extrémité alcyne (issue de l'amorçage) qui offre la possibilité d'un couplage par chimie click, et de fixer au moins deux résidus galactose sur la même fonction, conférant un

aspect dendritique de fonctionnalisation. Ceci permet de se rapprocher des structures de ciblage naturelles pour lesquelles quatre unités glucoses interagissent avec le récepteur lectine, conférant ainsi une énergie d'interaction galactose-lectine élevée par effet coopératif.⁶

Enfin, une étude préliminaire est également réalisée dans le but de mettre au point une synthèse de polymères fluorescents. Ces polymères amorcés ou terminés par un fluorophore de type dansyle permettraient de suivre les polyplexes lors des tests biologiques.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons, ainsi, dans une première partie, à la fonctionnalisation des motifs éthylènimine par l'histidine puis, dans une seconde partie, à la fonctionnalisation des extrémités de chaîne par le galactose ou par le dansyle. L'étude de ces diverses fonctionnalisations sera d'abord menée sur des polymères témoins afin de mettre au point les conditions de fonctionnalisation avant de réaliser celles-ci sur les copolymères PEI-*b*-PiPrOx, notés H_{Px}.

Partie I. Fonctionnalisation des motifs éthylènimine

Les polyéthylènimines modifiées par des résidus histidine, /PEI-his, synthétisées par Bertrand et *al.*⁴ ont démontré l'apport positif des résidus histidine sur le vecteur lors des tests de transfection. Cette stratégie est investiguée ici, dans le cadre des copolymères PEI-*b*-PiPrOx, avec pour objectif de greffer des résidus histidine sur 10 à 16 % des motifs EI du bloc PEI. Les polymères PEI(His)-*b*-PiPrOx, H_{Px-his}, pourront ensuite être testés en transfert de gènes afin de valider cette stratégie.

Ainsi, cette partie présente la synthèse de la L-histidine-N-acryloyle (HNA) ainsi que son greffage sur la bibliothèque de polymères du chapitre 2, soit les polymères témoins T_{HP5}, T_{HP6} et T_{HP8} et les copolymères H_{P5}, H_{P6} et H_{P8}.

I. Synthèse de la L-histidine-N-acryloyle (HNA)

La HNA est synthétisée *via* une réaction d'addition-élimination de la L-histidine sur le chlorure d'acryloyle (**Schéma III.1**). Cette synthèse est menée à -5 °C avec un ajout de chlorure d'acryloyle dans une solution aqueuse de L-histidine à l'aide d'un pousse seringue. Une solution de NaOH 6 M est ajoutée au milieu réactionnel conjointement à l'ajout du chlorure d'acryloyle pour maintenir un pH supérieur à 12. En effet, le sous-produit formé lors de cette réaction est l'acide chlorhydrique, cependant, afin de permettre la réaction d'addition-élimination, il est nécessaire de conserver la nucléophilie de l'amine primaire de la L-histidine. Son pK_a étant de 9,2, un pH supérieur à 12 permet de conserver la forme non protonnée de l'amine pour permettre la réaction de couplage.

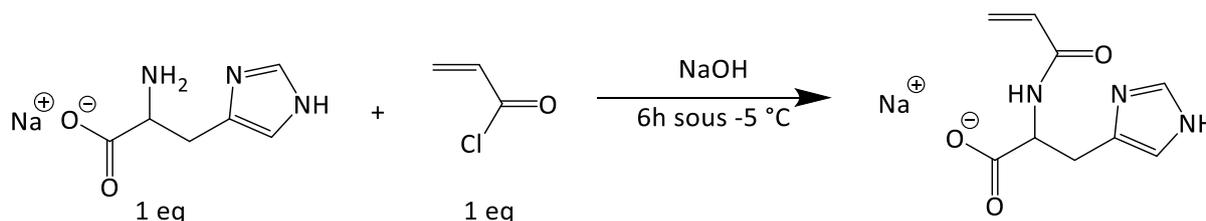


Schéma III.1 : Synthèse du L-histidine-N-acryloyle (HNA).

Après purification par précipitation à froid dans l'acétone, le produit est caractérisé par RMN ¹H dans D₂O. La formation du produit attendu est démontrée par la superposition des spectres de la L-histidine et de la HNA (**Figure III.1**). Les protons oléfiniques (a, a' et b) apparaissent dans la zone entre 5,8 et 6,5 ppm et un déblindage est observé pour les protons de la L-histidine, notamment au niveau du proton f qui se situe en alpha de la fonction amide créée.

De plus, les intégrales des signaux présentent les ratios attendus permettant de confirmer la structure du produit synthétisé.

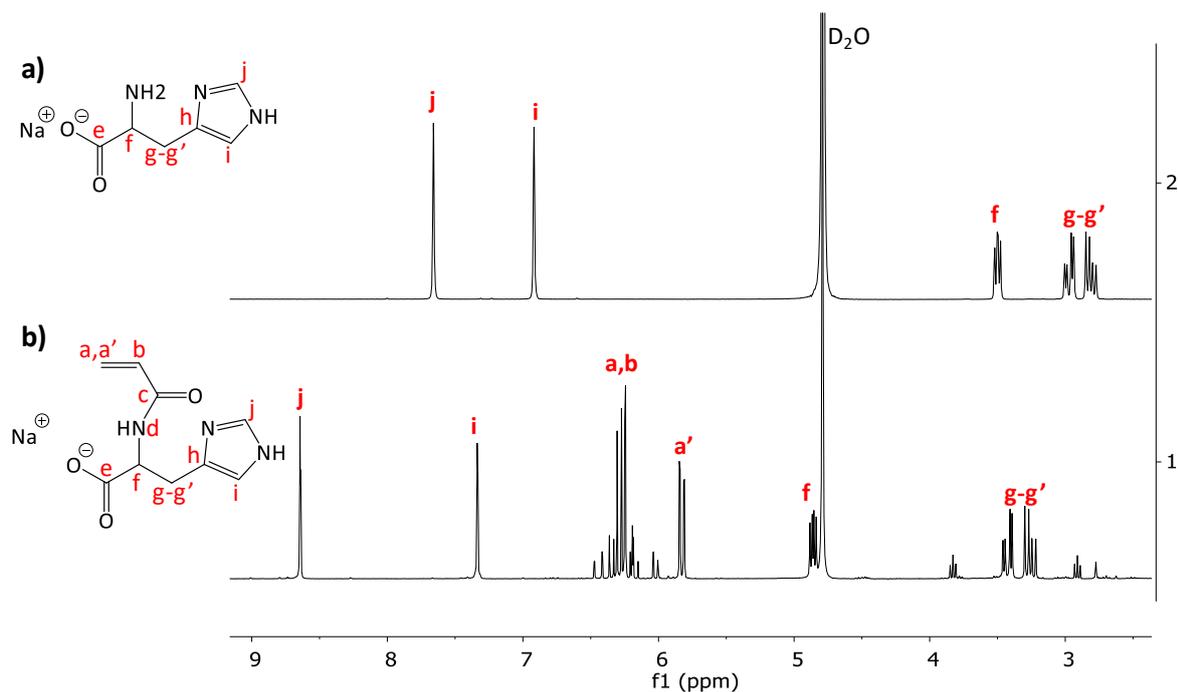


Figure III.1 : Spectres RMN ^1H de (a) la L-histidine et (b) de la HNA dans D_2O à $20\text{ }^\circ\text{C}$.

Nous remarquons également des signaux de faibles intensités à 2,9 et 3,8 ppm. Il a été montré que ces signaux appartiennent à une molécule résultant de l'homocouplage de deux molécules d'HNA. En effet, une précédente étude effectuée au sein de l'équipe par spectrométrie de masse ESI a permis d'identifier la molécule présentée au **Schéma III.2** comme le produit de cette réaction. Les protons méthylène entre la fonction amide et le cycle imidazole sont alors attribués aux signaux mentionnés ci-dessus.

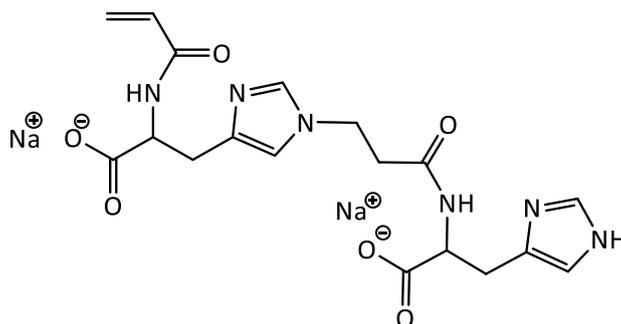


Schéma III.2 : Produit secondaire issu de l'homocouplage de deux molécules d'HNA.

Lors d'une synthèse de HNA, il est donc nécessaire d'évaluer le pourcentage d'homocouplage par RMN ^1H . En posant i , le pourcentage de molécules issues de l'homocouplage et p , le pourcentage de HNA, l'intégrale du signal situé à 3,8 ppm, $I_{3,8\text{ ppm}}$, est

proportionnelle à $2H \times i$, alors que celle du signal à 7,3 ppm, $I_{7,3\text{ppm}}$, est proportionnelle à $1H \times (2i + p)$. L'Équation III.1 peut alors être écrite, après avoir normalisé $I_{7,3\text{ppm}}$ à 1 sur le spectre RMN ^1H .

$$\begin{aligned} I_{3,8\text{ ppm}} &\leftrightarrow 2i \\ I_{7,3\text{ ppm}} &\leftrightarrow p + 2i \end{aligned}$$

Équation III.1 Soit, avec $I_{7,3\text{ ppm}} = 1$, $i = \frac{I_{3,8\text{ ppm}}}{(2 \times I_{7,3\text{ ppm}} - I_{3,8\text{ ppm}})}$

Diverses synthèses de HNA ont été réalisées en contrôlant plusieurs paramètres expérimentaux tout au long de la synthèse, tels que la température et le pH. Un taux d'homocouplage variable a été obtenu, comme en témoignent les résultats présentés dans le **Tableau III.1**. D'après des études préalablement réalisées dans l'équipe, un taux d'homocouplage inférieur à 10 % est considéré comme acceptable pour l'application visée. Ainsi, à l'exception du lot ASV-6, les différentes synthèses réalisées pourront être utilisées pour fonctionnaliser les polymères. Une seconde précipitation dans l'acétone à froid a été réalisée dans le cas de l'expérience ASV-3 en vue de diminuer le taux d'homocouplage. Cependant, contre toute attente, celui-ci est passé de 8 à 12%. Pour tous les autres essais, une seule précipitation a été opérée.

Tableau III.1 : Synthèses de HNA et évaluation de l'homocouplage en fonction du nombre de moles de L-histidine initial ($[\text{HNA}]_0 = 2 \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} > 12$).

Run	nL-histidine (mmol)	<i>i</i> homocouplage percentage (%)	<i>i</i> _{average} (%)
ASV-5	10	8	8
ASV-1	20	4	6 ± 2
ASV-3	20	8	
ASV-6	40	14	7,4 ± 4
SAK-6	40	7	
GwD-87	40	9	
GwD-129	40	2	
GwD-130	40	5	

Le HNA étant utilisé couramment au laboratoire, un scale-up de sa synthèse était souhaité tout en conservant le contrôle du taux d'homocouplage. Ainsi, la synthèse, habituellement réalisée avec 20 mmol de L-histidine, a été réalisée avec 10 mmol et 40 mmol afin d'étudier l'influence de la quantité de matière initiale de L-histidine sur le taux

d'homocouplage. Nous constatons que ce paramètre a peu d'influence sur le taux d'homocouplage, car le taux moyen s'échelonne de 6 à 8% selon l'expérience. Par la suite, les synthèses ont donc été effectuées avec 40 mmol de L-histidine. Ce scale-up de la réaction permet un gain de temps puisqu'une synthèse et ses purifications nécessitent 4 jours de travail.

II. Modification des polymères à base de PEI par la HNA

Dans le but de fonctionnaliser la bibliothèque de *l*PEI et de PEI-*b*-PiPrOx, nous nous sommes appuyés sur les travaux de Bertrand et *al.*⁴, ainsi que sur de récents résultats de l'équipe présentés, notamment, dans la thèse de L. Plet.⁷ La fonctionnalisation de la bibliothèque de *l*PEI témoins (T_{HP5} à T_{HP8}) a tout d'abord été réalisée, l'étude a été, ensuite, étendue à la modification des copolymères PEI-*b*-PiPrOx (H_{P5} à H_{P8}).

II.1. Fonctionnalisation des *l*PEI

La fonctionnalisation des motifs EI par la HNA est réalisée par une addition de Michael entre l'amine secondaire des unités éthylènimine et la fonction acrylamide de la HNA selon le **Schéma III.3** dans le but d'obtenir un taux de modification des unités EI compris entre 10 et 16 %. Un ajout lent d'HNA dans une solution aqueuse de PEI sous agitation et à reflux est réalisé à l'aide d'un pousse seringue pendant 24 h, puis le milieu réactionnel est conservé sous agitation et à reflux pendant 24 h supplémentaires. Cet ajout contrôlé de HNA permet de favoriser la réaction des résidus histidine avec les motifs EI et de limiter l'homocouplage du HNA non désiré. Après précipitation dans l'éthanol, le polymère modifié est dialysé contre l'eau puis lyophilisé.

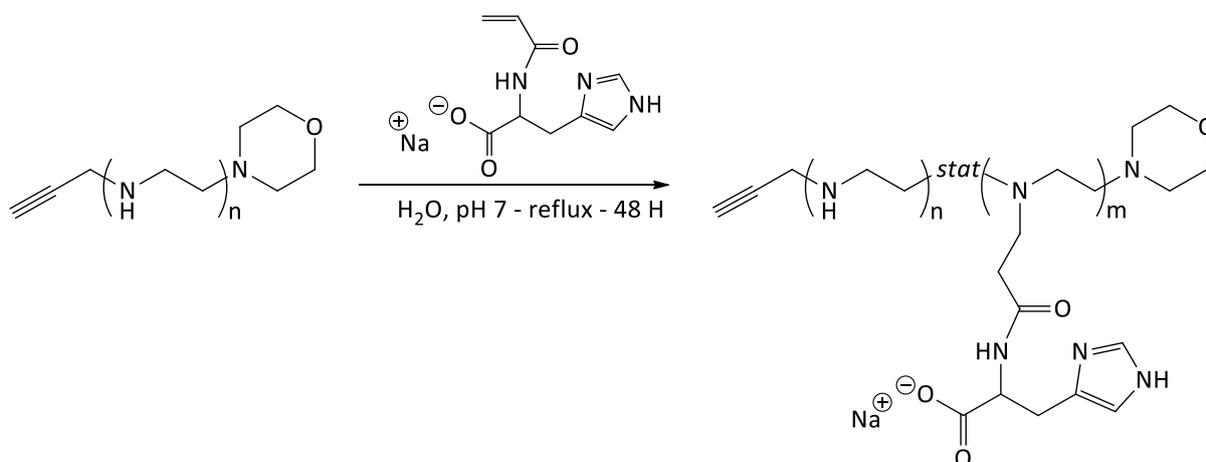


Schéma III.3 : Modification de la PEI par la HNA *via* une addition de Michael.

La modification est réalisée sur les polymères T_{HP5} , T_{HP6} et T_{HP8} dans le but d'obtenir les polymères $T_{HP5-his}$, $T_{HP6-his}$ et $T_{HP8-his}$. Les conditions expérimentales ainsi que les diverses caractérisations sont répertoriées dans le **Tableau III.2**.

Tableau III.2 : Modification des /PEI par la HNA.

Type	Run	PEI batch	Mn_{th} starting PEI ($kg.mol^{-1}$)	HNA batch	n_{HNA} (mmol)	Eq_{HNA}/Eq_{EI}	Grafted HNA (%)
$T_{HP5-his}$	GwD-172	GwD-132	14.5	GwD-130	2.8	0.30	11.5
$T_{HP6-his}$	GwD-154	GwD-137	9.7	GwD-129	1.7	0.30	12.8
$T_{HP8-his}$	GwD-156	GwD-138	4.8	GwD-130	1.7	0.30	8.1

Afin de caractériser les polymères obtenus et d'évaluer le taux de modification, une analyse RMN 1H des polymères purifiés est réalisée dans D_2O . Le spectre du polymère $T_{HP6-his}$ (GwD-154) est donné en **Figure III.2**. Le couplage des molécules HNA sur les motifs EI est mis en évidence par les signaux à 7,3 ppm et 8,6 ppm correspondant aux protons i et j des cycles imidazole ainsi que par l'absence des signaux des protons oléfiniques a, a' et b (protons insaturés de la HNA libre) entre 5,8 et 6,5 ppm. Le massif entre 2,2 ppm et 4,7 ppm est attribué aux protons des unités EI substituées et non-substituées. Il n'est pas possible de dire si une molécule HNA se couple sur un résidu HNA déjà couplé à un motif EI, puisque les signaux caractéristiques de cette réaction (2.9 et 3.8 ppm) sortent dans le massif. Cependant, cette réaction est défavorisée par l'ajout lent de la HNA dans le milieu réactionnel et par le fait que les atomes d'azote des motifs EI sont plus nucléophiles que ceux des cycles imidazole. Le taux de modification des unités EI sera déterminé en considérant cette hypothèse.

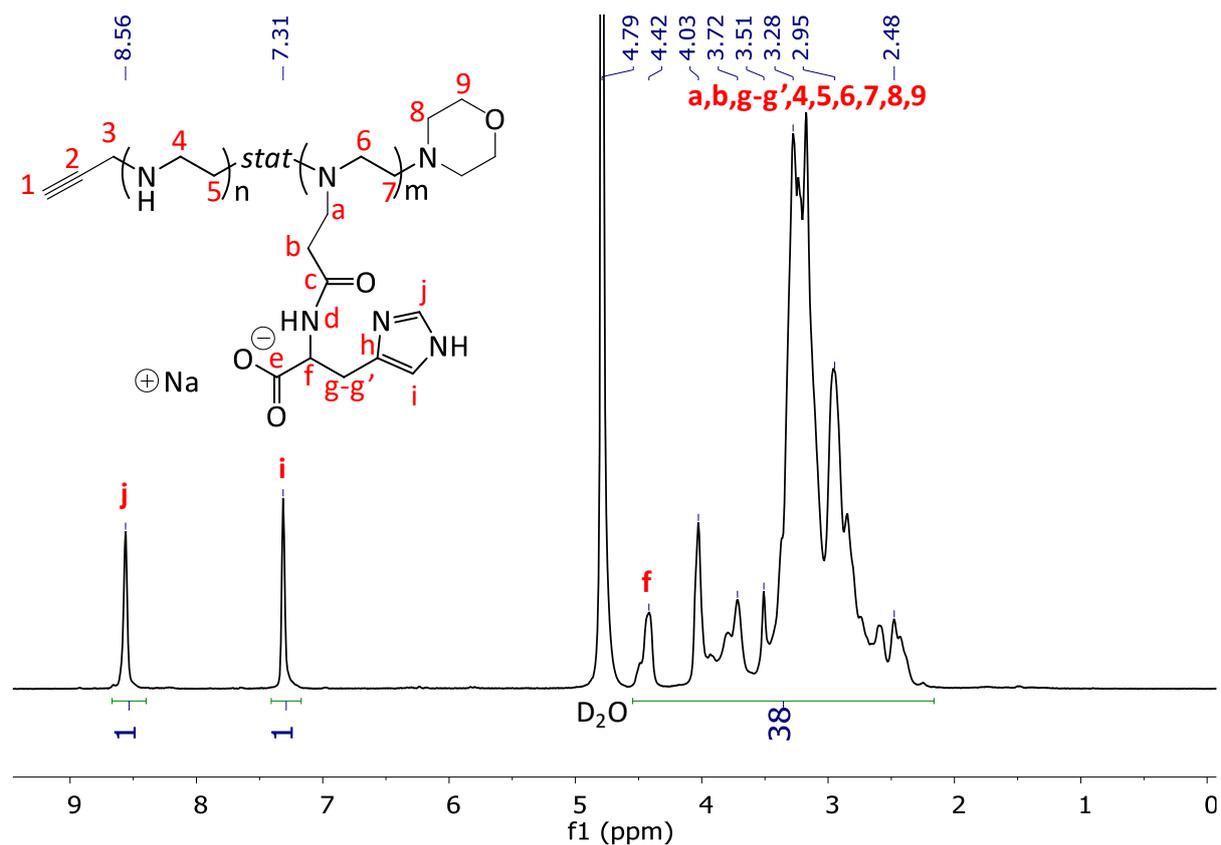


Figure III.2 : Spectre RMN ^1H du polymère $\text{T}_{\text{HP6-his}}$ (GwD-154) dans D_2O à $20\text{ }^\circ\text{C}$.

Dans le but de calculer le taux de modification des motifs EI par les molécules de HNA, l'intensité des signaux des résidus HNA aisément identifiables au dessus de 7 ppm est comparée à celle des unités EI. Ainsi, en notant f le taux de fonctionnalisation, l'intégrale du signal situé à 8,6 ppm (proton i), $I_{8,6\text{ ppm}}$, est proportionnelle à $1\text{H} \times f$, alors que le massif situé entre 2,2 ppm et 4,7 ppm, $I_{2,2-4,7\text{ ppm}}$, est proportionnel à $4\text{H} \times (1-f) + 11\text{H} \times f$, soit 4 protons appartenant à des unités EI non modifiées (protons 4 et 5) et 11 protons appartenant à des unités modifiées (protons 6, 7, a, b, f et g-g'). L'Équation III.2 peut alors être écrite.

$$I_{8,6\text{ ppm}} \leftrightarrow 1f$$

$$I_{2,2-4,7\text{ ppm}} \leftrightarrow 4(1-f) + 11f$$

Équation III.2

$$\text{Soit } f = \frac{4 \times I_{8,6\text{ ppm}}}{(I_{2,2-4,7\text{ ppm}} - 7 \times I_{8,6\text{ ppm}})}$$

Les calculs réalisés sur les trois polymères modifiés montrent des taux de couplage entre 8,1 et 12,8 % (**Tableau III.2**). Ces résultats sont proches du taux de couplage idéal situé entre 10 et 16 % permettant un bénéfice intéressant en transfert de gènes.

II.2. Fonctionnalisation des PEI-*b*-PiPrOx

La stratégie de fonctionnalisation par la HNA étant mise au point sur les homopolymères /PEI, la modification des copolymères H_{P5} à H_{P8} (PEI-*b*-PiPrOx) a été réalisée dans le but d'obtenir les polymères $H_{P5\text{-his}}$ à $H_{P8\text{-his}}$ (PEI(his)-*b*-PiPrOx) selon le **Schéma III.4**. Ces réactions sont menées comme précédemment en milieu aqueux à reflux. Les conditions de synthèse ainsi que les taux de greffage obtenus sont résumés dans le **Tableau III.3**.

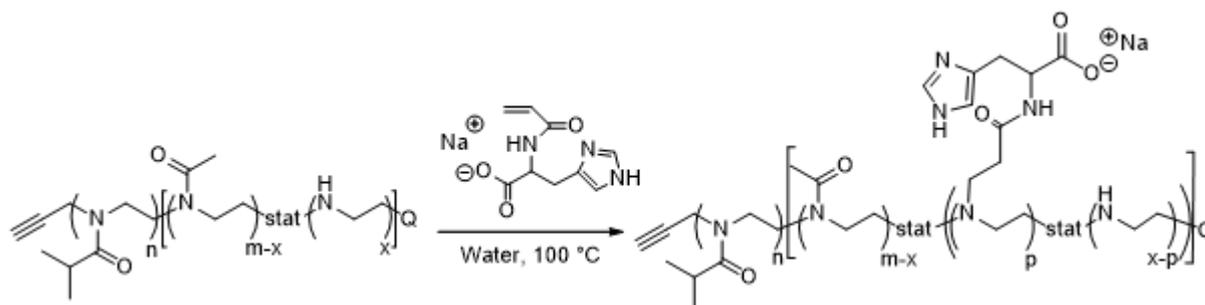


Schéma III.4 : Modification des copolymères PEI-*b*-PiPrOx par de la HNA ($m-x \ll x$).

Tableau III.3 : Modification des PEI-*b*-PiPrOx par de la HNA.

Type	Run	PEI batch	$M_{n\text{th}}$ starting PEI ($\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$)	HNA batch	Time (days)	[EI] ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	n_{HNA} (mmol)	eq_{HNA} / eq_{EI}	Grafted HNA (%)
$H_{P6\text{-his}}$	GwD-97	GwD-92	9.2	GwD-87	2	0.48	0.7	0.3	0.95
	SAK-3	SAK-02	9.4	GwD-87	2	0.82	1.4	0.3	0.8

Dans un premier temps, les conditions mises au point sur les homopolymères ont été utilisées (GwD-97). La **Figure III.3** présente le spectre RMN ^1H de GwD-97 obtenu après purification.

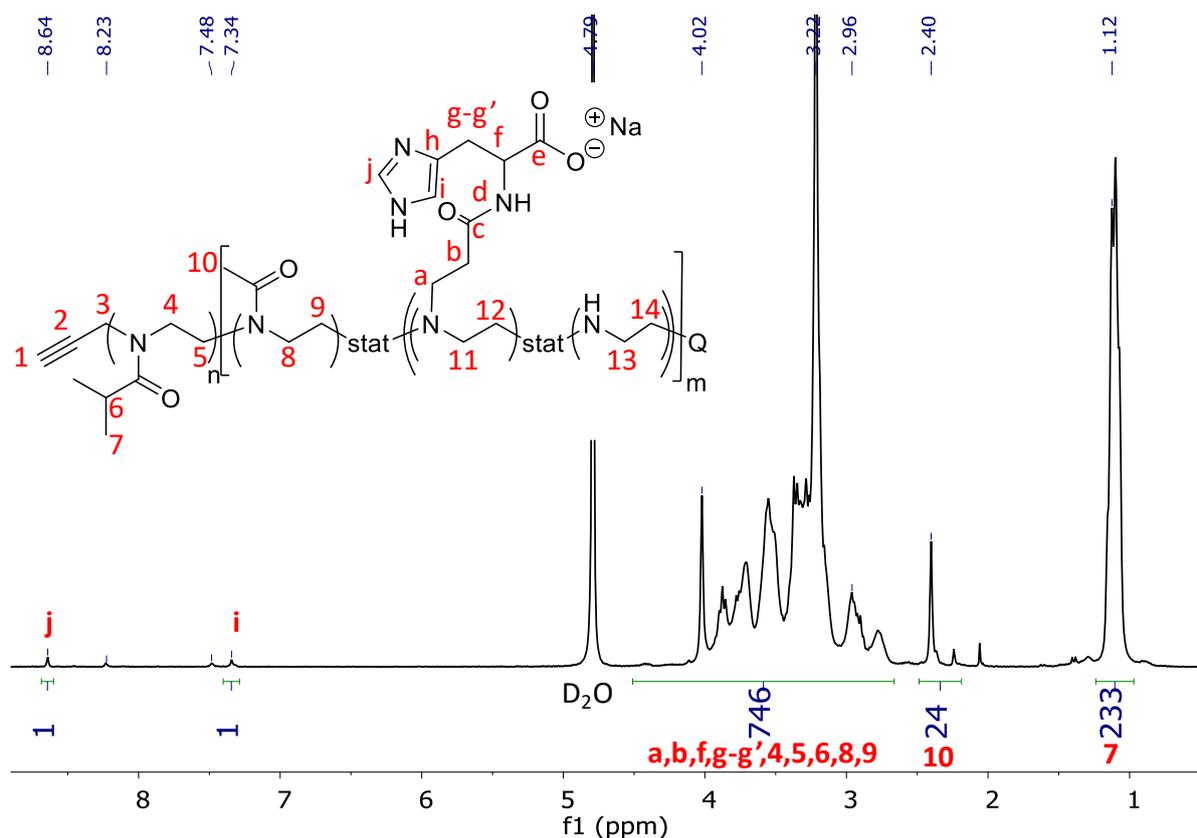


Figure III.3 : Spectre RMN ^1H du copolymère GwD-92 modifié par la HNA.

Le taux de couplage est calculé avec la même méthodologie que précédemment. Cependant, il est nécessaire de prendre en compte que le signal entre 2,5 ppm et 4,7 ppm correspond aux protons des unités EI modifiées et non modifiées mais également aux protons méthylène des unités iPrOx et des unités MeOx résiduelles et aux protons méthine des unités iPrOx. Ainsi, dans ce massif, résonnent 4 protons appartenant à des unités EI non modifiées (protons 13 et 14), 11 protons appartenant à des unités EI modifiées (protons 11, 12, a, b, f et g-g'), 5 protons appartenant à des unités iPrOx (protons 4, 5 et 6) et 4 protons appartenant à des unités MeOx résiduelles (protons 8 et 9). En prenant en compte ces différents motifs, l'Équation III.3 peut alors être écrite.

$$I_{8,6 \text{ ppm}} \leftrightarrow 1f$$

$$I_{2.5-4.7 \text{ ppm}} - \frac{I(H_7)}{6} \times 5 - \frac{I(H_{10})}{3} \times 4 \leftrightarrow 4(1-f) + 11f$$

Équation III.3 Soit $f = \frac{4 \times I_{8,6 \text{ ppm}}}{I_{2.5-4.7 \text{ ppm}} - \frac{I(H_7)}{6} \times 5 - \frac{I(H_{10})}{3} \times 4 - 7 \times I_{8,6 \text{ ppm}}}$

Dans le cas de GwD-97, un très faible taux de modification après purification est obtenu (0,95 %). La concentration en motifs EI a été augmentée dans l'expérience SAK-3 (en gardant constant le ratio HNA/EI) afin de favoriser le couplage, néanmoins, le taux de modification reste très faible (0.8 %). De plus, la présence de signaux secondaires à 7,5 ppm et 8,2 ppm suggèrent la présence de HNA libre résiduelle. Au vu de ces résultats non concluants, une étude a été menée afin d'identifier le ou les paramètre(s) limitant(s).

II.2.a. Etude du pH

Les copolymères utilisés sont formés d'un bloc PEI cationique ainsi que d'un bloc PiPrOx. La solubilité du copolymère est donc dépendante du pH du milieu réactionnel. En effet, si le pH est trop basique, les motifs EI de la PEI ne sont pas cationisés et sont alors insolubles dans l'eau. Un polymère PEI-*b*-PiPrOx (SAK-2) a été analysé par DLS en fonction du pH : une mesure est réalisée après la mise en solution du polymère dans de l'eau à pH 7, puis après l'acidification du milieu à pH 1 et enfin, après l'augmentation progressive du pH de 1 à 6,5 (**Figure III.5**). Nous observons alors que la solubilisation des chaînes polymère n'est pas satisfaisante lors de la solubilisation dans l'eau puisque des agrégats sont observés (D_H en nombre = 835 nm) malgré un aspect limpide macroscopiquement. L'acidification suivie d'une neutralisation lente a, néanmoins, permis la solubilisation des chaînes polymère avec un D_H en nombre de 3,5 nm. Les chaînes sont alors sous forme d'unimères. Dans la suite de l'étude, cette méthode de solubilisation sera mise en œuvre préalablement à la réaction de modification par la HNA.

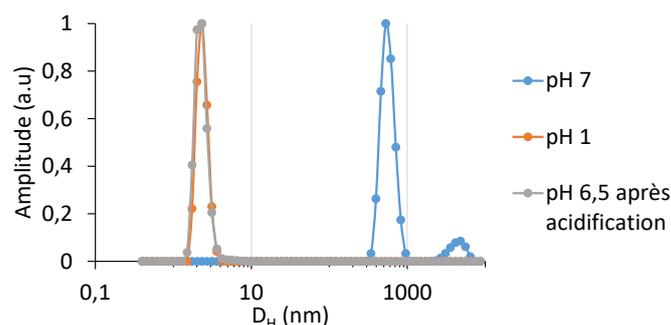


Figure III.4 : Mesure de la taille des objets par DLS en nombre pour SAK-2 en solution dans l'eau à 20 °C.

II.2.b. Etude en température

D'autre part, le comportement des copolymères portant un bloc PiPrOx, en température a été analysé. En effet, les homopolymères PiPrOx présentant une LCST aux alentours de 45 °C, une transition de phase peut être observée pour le copolymère PEI-*b*-PiPrOx lors de la réaction de couplage puisque celle-ci est effectuée à reflux dans l'eau. Une agrégation des

chaînes polymère limiterait alors la fonctionnalisation des unités EI par la HNA. La **Figure III.5** présente l'analyse par DLS en fonction de la température d'une solution aqueuse de copolymère SAK-2 à 0,48 M en unité EI. Contrairement à l'analyse des copolymères après hydrolyse par nano-DSC, nous observons une LCST à 55 °C. Cette différence est expliquée par les modifications de pH. En effet, ici, le polymère est acidifié à pH 1 avant un retour à pH 7 ; lors du passage à pH 1, les motifs EI sont alors protonés permettant une bonne solubilité des chaînes macromoléculaire. Les agrégats sont alors dispersés et une LCST est visible lors de l'augmentation de température. L'influence du pH et donc du taux de protonation du bloc EI n'ayant pas été analysé dans le chapitre 2, aucune LCST n'est donc observée par nano-DSC pour les copolymères hydrolysés.

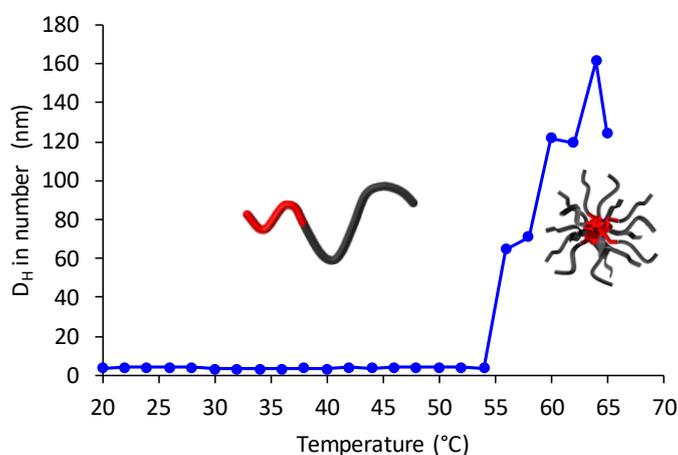


Figure III.5 : Etude en température par DLS d'une solution aqueuse du copolymère H_{P6}, SAK-2 ([EI] = 0,48 M). Rampe de 20 à 65 °C, pH 7.

Une organisation des chaînes polymère est alors mise en évidence au-delà de 55 °C par l'augmentation importante de la taille des objets analysés. Les précédentes réactions de couplage (**Tableau III.3**) ayant été effectuées sans solubilisation préalable du polymère en milieu acide et à reflux dans l'eau, les motifs EI étaient très peu accessibles expliquant les très faibles taux de fonctionnalisation obtenus.

Ainsi, une fonctionnalisation a été réalisée en dessous de la température de transition de phase avec l'acidification puis la neutralisation de la solution polymère comme mentionnée précédemment. De plus, le nombre d'équivalent de HNA a été doublé afin de favoriser la réaction. Les conditions expérimentales et le taux de couplage obtenu sont présentés dans le **Tableau III.4**.

Tableau III.4 : Modification de H_{P5} (SAK-4) par la HNA dans les nouvelles conditions ([EI] = 0,48 M).

Type	Run	PEI batch	$M_{n_{th}}$ starting PEI (kg.mol ⁻¹)	HNA batch	Time (days)	Temp (°C)	n_{HNA} (mmol)	eq_{HNA} / eq_{EI}	Grafted HNA (%)
H _{P5-his}	GwD-123	SAK-4	12.6	SAK-6	10	50	2.8	0.6	0.6

Cette réaction est réalisée sur un temps beaucoup plus long en raison de la diminution de la température de 100 °C à 50 °C. Cependant, la modification obtenue avec ces nouveaux paramètres de réaction n'a pas permis l'obtention d'un taux de greffage satisfaisant puisque celui-ci est de 0,6 %.

II.2.c. Etude du solvant

La fonctionnalisation des copolymères par la HNA n'étant pas concluante dans l'eau, nous nous sommes intéressés à d'autres solvants notamment l'éthanol. La solubilisation dans l'éthanol étant aisée, la réaction de couplage a été réalisée dans cet alcool porté à reflux avec 0,6 équivalents de HNA comme précédemment. De plus, diverses publications mentionnant l'ajout d'une base afin d'améliorer l'addition de Michael, de la N,N-diisopropyléthylamine (DIPEA) a été ajoutée au milieu réactionnel dans cet objectif.⁸ Le **Tableau III.5** répertorie les différentes réactions réalisées dans ces conditions ainsi que les taux de modification obtenus.

Tableau III.5 : Modification des PEI-*b*-PiPrOx par la HNA dans l'éthanol à reflux ([EI] = 0,16 M).

Type	Run	PEI batch	$M_{n_{th}}$ starting PEI (kg.mol ⁻¹)	HNA batch	Time (days)	n_{HNA} (mmol)	Eq_{HNA} / eq_{EI}	Eq_{DIPEA} / eq_{EI}	Grafted HNA (%)
H _{P5-his}	SH-02	SAK-4	12.6	SAK-6	2	1.4	0.6	0.6	10.0
	GwD-146	SAK-4	12.6	GwD-129	2	1.13	0.6	0.6	18.7
H _{P6-his}	GwD-149	GwD-121	8.9	GwD-129	2	0.93	0.6	0.6	4.3
	GwD-170	GwD-121	8.9	GwD-130	3	0.93	0.6	0.6	≈ 8.4
H _{P8-his}	GwD-150	SAK-8	4.3	GwD-129	2	0.68	0.6	0.6	4

Les calculs de fonctionnalisation sont également réalisés grâce à l'**Équation III.3**. Concernant les polymères de type H_{P5-his}, des taux de greffage satisfaisants sont obtenus lors des réactions SH-02 et GwD-146, respectivement 10,0 % et 18,7 %. Néanmoins, sur les copolymères de type H_{P6-his} et H_{P8-his}, un taux de greffage acceptable n'est pas atteint dans ces

Chapitre 3

conditions (GwD-149 et GwD-150). La réaction est, alors, menée à nouveau dans les mêmes conditions et sur un temps plus long (3 jours au lieu de 2 jours) pour le polymère H_{P6} (GwD-170). Le couplage obtenu est, alors, plus élevé (8,4 %) mais reste inférieur au taux de couplage idéal de 16 %.

Les investigations afin de comprendre les limites de cette fonctionnalisation n'ont pas été menées plus loin, cependant, le pourcentage de motifs EI par rapport aux motifs iPrOx est une limite à envisager. Les polymères H_{P5} présentant une plus grande quantité d'unités EI sont plus facilement fonctionnalisés. Pour les polymères H_{P6} et H_{P8}, la chaîne PEI étant plus courte, le pourcentage de motifs PiPrOx augmente et semble être un facteur limitant à l'addition de Michael.

Partie II. Fonctionnalisation des extrémités de chaîne

La synthèse de poly(oxazoline)s permet l'introduction de groupements d'intérêt sur les extrémités de chaîne ou sur les motifs. Ainsi, un choix pertinent de l'amorceur, de l'agent de terminaison ou du monomère permet la synthèse de polymères fonctionnels. Néanmoins, l'étape d'hydrolyse nécessaire à l'obtention des polymères à base de PEI doit être prise en considération afin de protéger, si nécessaire, les fonctions introduites lors de la synthèse macromoléculaire.

Dans cette partie, nous nous intéressons à deux fonctionnalisations des extrémités de chaîne. Tout d'abord, dans le but d'introduire une unité galactose, un ligand de ciblage cellulaire, une fonctionnalisation post-polymérisation sera réalisée sur une extrémité de chaîne. Le galactose étant sensible à l'hydrolyse, celui-ci ne peut être introduit qu'après cette étape. D'autre part, une fonctionnalisation par « grafting onto » et « grafting from » sera étudiée avec pour objectif l'introduction d'un fluorophore, ces polymères fluorescents pouvant ensuite être utilisés dans des expériences *in vitro* et/ou *in vivo* pour suivre leur devenir.

I. Fonctionnalisation par le galactose

Les récents développements de thérapie à base de nanoparticules véhiculant des médicaments montrent que la délivrance spécifique au site ciblé est une approche permettant la concentration du médicament dans les tissus souhaités.^{9,10} Ainsi, dans le cadre de nanoparticules de polymère, la conception d'un système de ciblage semble importante afin d'améliorer l'efficacité des traitements.¹¹ Dans nos recherches, deux organes cibles sont identifiés : les poumons et le foie. Divers travaux démontrent que des récepteurs au galactose sont présents abondamment dans ces deux organes : les poumons présentent des lectines réceptrices du galactose¹² et le foie exprime des récepteurs des asialoglycoprotéines (ASGPR).¹³

Cette fonctionnalisation par le galactose a été utilisée dans le cadre de recherches en transfert de gènes, notamment par Huang *et al.*¹⁴ pour cibler des cellules cancéreuses hépatiques ou par Chen *et al.*¹⁵ pour améliorer la transfection dans les cellules pulmonaires. Les résultats mettent en évidence une amélioration du transfert de gènes lorsque des polyplexes portant des résidus galactose sont utilisés en comparaison des polyplexes non fonctionnalisés.

Pour réaliser une post-fonctionnalisation de chaînes macromoléculaires, il est nécessaire de mettre en œuvre des réactions chimiques rapides et totales afin de garantir un couplage maximal entre la chaîne polymère et la molécule d'intérêt. Dans notre cas, nous avons décidé

de réaliser une chimie click par couplage thiol-yne. En effet, l'introduction d'une fonction alcyne lors de la synthèse macromoléculaire des copolymères à base d'oxazoline a été réalisée en utilisant un amorceur propargyle (cf chapitre 2). La stratégie ciblée doit permettre l'ajout de deux résidus galactose par chaîne macromoléculaire, contrairement à un couplage thiol-ène où seul un résidu galactose est introduit. Comme expliqué en introduction, ce couplage bidenté permet une amélioration de l'interaction avec les récepteurs du galactose en comparaison à un monodenté.⁶

Pour cela, un galactose portant un groupement thiol est synthétisé : le 3-mercaptopropyl- β -D-galactopyranoside.¹⁶ Sa synthèse réalisée par le Dr. Vincent Corcé (IPCM – équipe Chembio) est présentée sur le **Schéma III.5** (les spectres RMN ^1H , ^{13}C et HSQC sont présents en **Annexe III.1**) Le groupement espaceur propyle est important ici afin de limiter la gêne stérique lors du futur couplage thiol-yne.

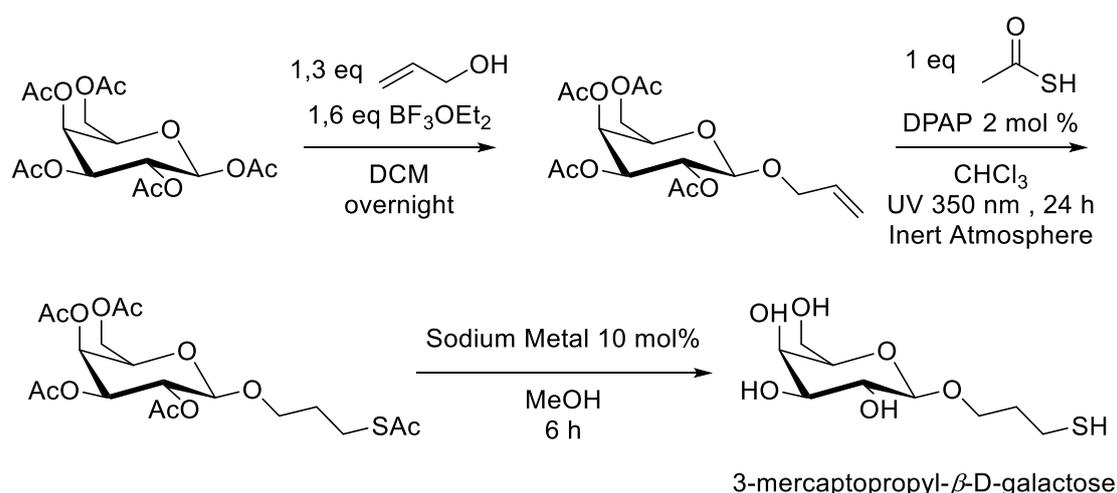


Schéma III.5 : Synthèse du 3-mercaptopropyl- β -D-galactopyranoside.

Ainsi, la modification de la fonction alcyne terminale des chaînes polymère PEI-*b*-PiPrOx par du thio-galactose *via* une réaction thiol-yne est étudiée afin de développer des polyplexes fonctionnels. Un homopolymère PiPrOx de faible masse molaire et portant une fonction alcyne terminale sera tout d'abord utilisé afin de mettre au point les conditions expérimentales (**Figure III.6.a**). Puis, l'étude sera poursuivie par la fonctionnalisation des copolymères de type H_{P_x} (**Figure III.6.b**).

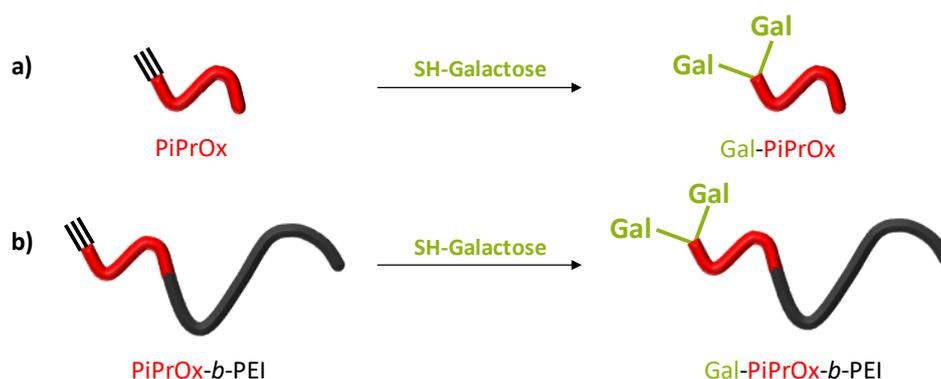


Figure III.6 : Fonctionnalisation de l'alcyne terminale par deux molécules de galactose sur (a) un homopolymère PiPrOx modèle et sur (b) un copolymère PiPrOx-*b*-PEI.

I.1. Modification de la PiPrOx

Afin d'éviter de consommer abondamment le galactose fonctionnalisé, du benzyl mercaptan a été utilisé dans un premier temps pour fonctionnaliser l'homopolymère PiPrOx. Cette fonctionnalisation réalisée dans différents solvants organiques (DMF ou butanol) en présence de 2,2-Diméthoxy-2-phenylacétophénone (DMPA) et sous lampe UV a permis l'obtention d'un taux de fonctionnalisation aux alentours de 75 % (soit 1.5 eq. Gal-SH / chaîne polymère). Cependant, cette stratégie n'a pas été plus développée dû à un manque de solubilité du copolymère PiPrOx-*b*-PEI dans les solvants utilisés.

Nous nous sommes donc intéressés à la réalisation d'un couplage thiol-yne dans un mélange eau/éthanol en nous appuyant sur les travaux de Dey et *al.*¹⁷ La réaction mise en jeu est présentée sur le **Schéma III.6**. L'homopolymère PiPrOx, GwD-110 (5,7 kDa), solubilisé dans un mélange EtOH/H₂O 1/1 v/v est mis en réaction avec le 3-mercaptopropylgalactose en présence de tert-butylhydroperoxyde (TBHP). Diverses conditions ont été testées. Elles sont répertoriées dans le **Tableau III.6**.

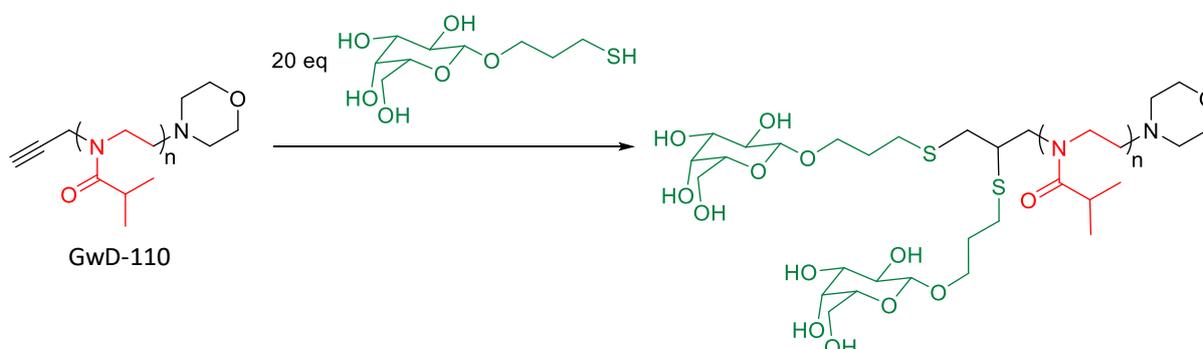


Schéma III.6 : Fonctionnalisation de l'homopolymère PiPrOx par le 3-mercaptopropyl-β-D-galactopyranoside.

Tableau III.6 : Couplage thiol-yne sur GwD-110.

Run	Eq thiol/ TBHP/ triple bond	Glassware	Conditions	Solvent	Time (h)	Coupling rate (%)
GwD-125		glass cuvette	UV ₁	EtOH/H ₂ O 1/1	24	3.6
GwD-125bis	20/0.2/1	glass cuvette	35°C, no UV	EtOH/H ₂ O 1/1	24	14
GwD-128		quartz cuvette	UV ₁	EtOH/H ₂ O 1/1	24	27
GwD-145		glass shlenck	UV ₂	EtOH	24	53

Activation by TBHP (tert-butylhydroperoxyde); UV₁: 365 nm, 4 Watts; UV₂: 300 nm, 7 × 35 Watts; [polymer] = 13 mM.

La **Figure III.7** présente le spectre RMN de GwD-128 purifié. Le taux de modification de l'extrémité alcyne est déterminée par comparaison des signaux des protons 3 des chaînes non modifiées et des protons d des chaînes modifiées. En posant f , le taux de fonctionnalisation de la fonction alcyne, l'intégrale du signal entre 4,18 et 4,30 ppm correspondant aux protons 3 des chaînes non fonctionnalisées est proportionnelle à $2H \times (1-f)$ et l'intégrale du signal à 4,15 ppm correspondant aux protons d des chaînes fonctionnalisées est proportionnelle à $2H \times f$. l'**Équation III.4** peut, alors, être écrite. Ainsi, un taux de fonctionnalisation de 100 % signifie que toutes les chaînes PiPrOx sont fonctionnalisées par deux 3-mercaptopropylgalactose. D'après Bowman & coll.¹⁸, après le couplage du premier thiol sur la triple liaison, une fonction intermédiaire sulfure de vinyle apparait. Ils démontrent que la vitesse d'addition du thiol sur cette fonction est environ 3 fois supérieure à celle d'addition du thiol sur l'alcyne. En supposant dans notre cas que le bras espaceur propyle entre le sucre et la fonction thiol est suffisant pour s'affranchir d'une gêne stérique, on peut supposer que le couplage deux galactoses par triple liaison sera favorisé.

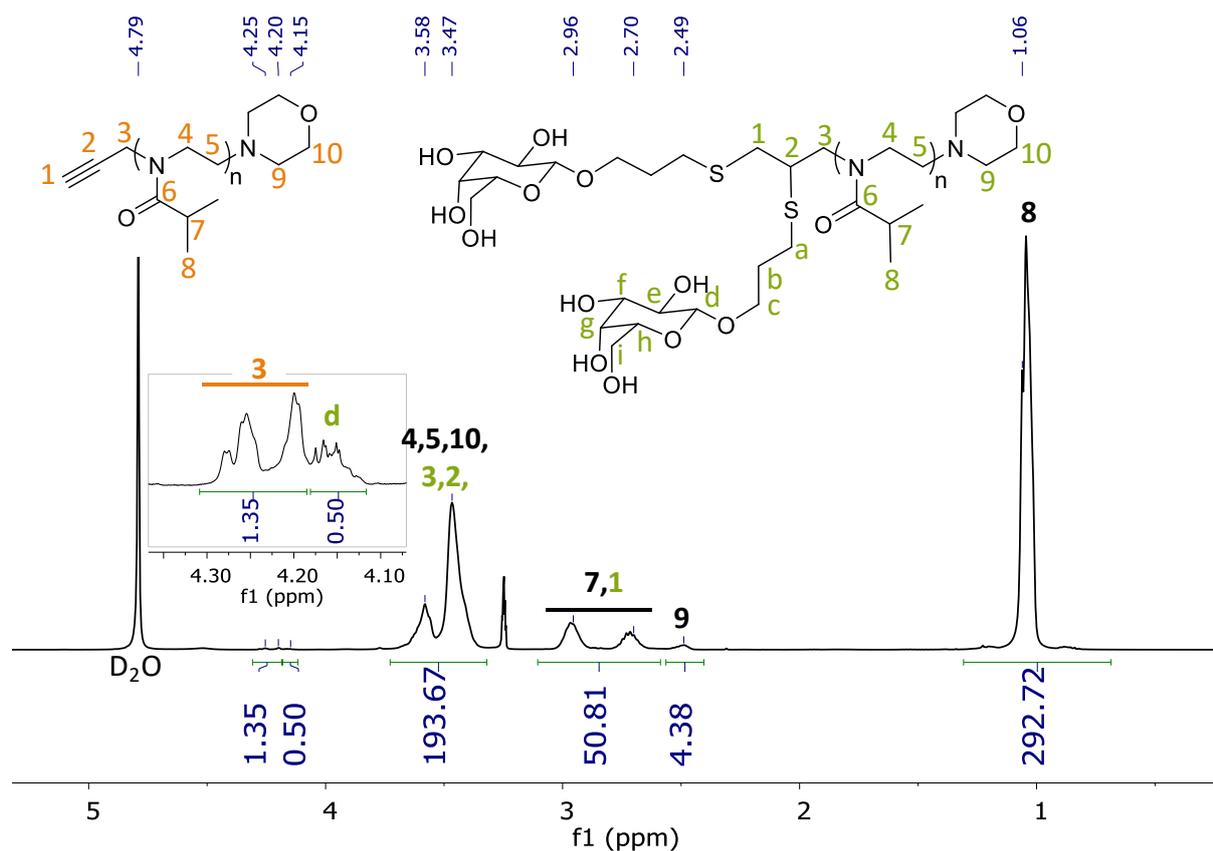


Figure III.7 : Spectre RMN de GwD-128 dans D₂O à 20 °C (l'attribution du spectre est faite en portant des chiffres en orange pour les protons spécifiques aux chaînes PiPrOx non fonctionnalisées, en vert pour les protons spécifiques aux chaînes fonctionnalisées et en noir pour les protons communs aux 2 types de chaînes).

$$I_{4.18-4.3 \text{ ppm}} \leftrightarrow 2 \times (1 - f)$$

$$I_{4.15 \text{ ppm}} \leftrightarrow 2f$$

Équation III.4 Soit $f = \frac{I_{4.15 \text{ ppm}}}{I_{4.15 \text{ ppm}} + I_{4.18-4.30 \text{ ppm}}}$

Diverses réactions ont été nécessaires afin de mettre au point des conditions permettant un couplage satisfaisant. Ces réactions ne sont pas menées dans l'eau pure car la source d'irradiation UV apporte de l'énergie thermique. Celle-ci n'étant pas contrôlée, une augmentation de la température trop importante, au-dessus de la LCST des PiPrOx, empêcherait une fonctionnalisation correcte des fins de chaîne. Le mélange eau/éthanol 50/50 v/v à faible température permet de s'affranchir de la LCST des PiPrOx. Les réactions ont tout d'abord été réalisées à l'aide d'une lampe UV de faible puissance pour limiter le dégagement thermique ou à 35 °C sans irradiation UV pendant 24 h (GwD-125 et GwD-125bis respectivement). Cependant, les taux de couplage obtenus sont faibles : 3,6 % et 14 % respectivement.

Afin d'améliorer la fonctionnalisation, l'influence de la nature de la cuve de réaction a été étudiée en utilisant une cuve en quartz. Ce changement de verrerie engendre moins de perte des rayonnements UV et ainsi une amélioration du taux de couplage de 3,6 % à 27 %.

Ce polymère purifié a été caractérisé par RMN HSQC (**Figure III.8**) et analysé par CES DMF (**Figure III.9**). La RMN 2D valide l'attribution du proton d (4,15 ppm) lié au carbone anomérique d (110 ppm) et la CES monomodale démontre l'absence de couplage entre deux chaînes PiPrOx par mécanisme radicalaire. Cela argumente alors la fonctionnalisation des chaînes PiPrOx par plusieurs résidus galactose.

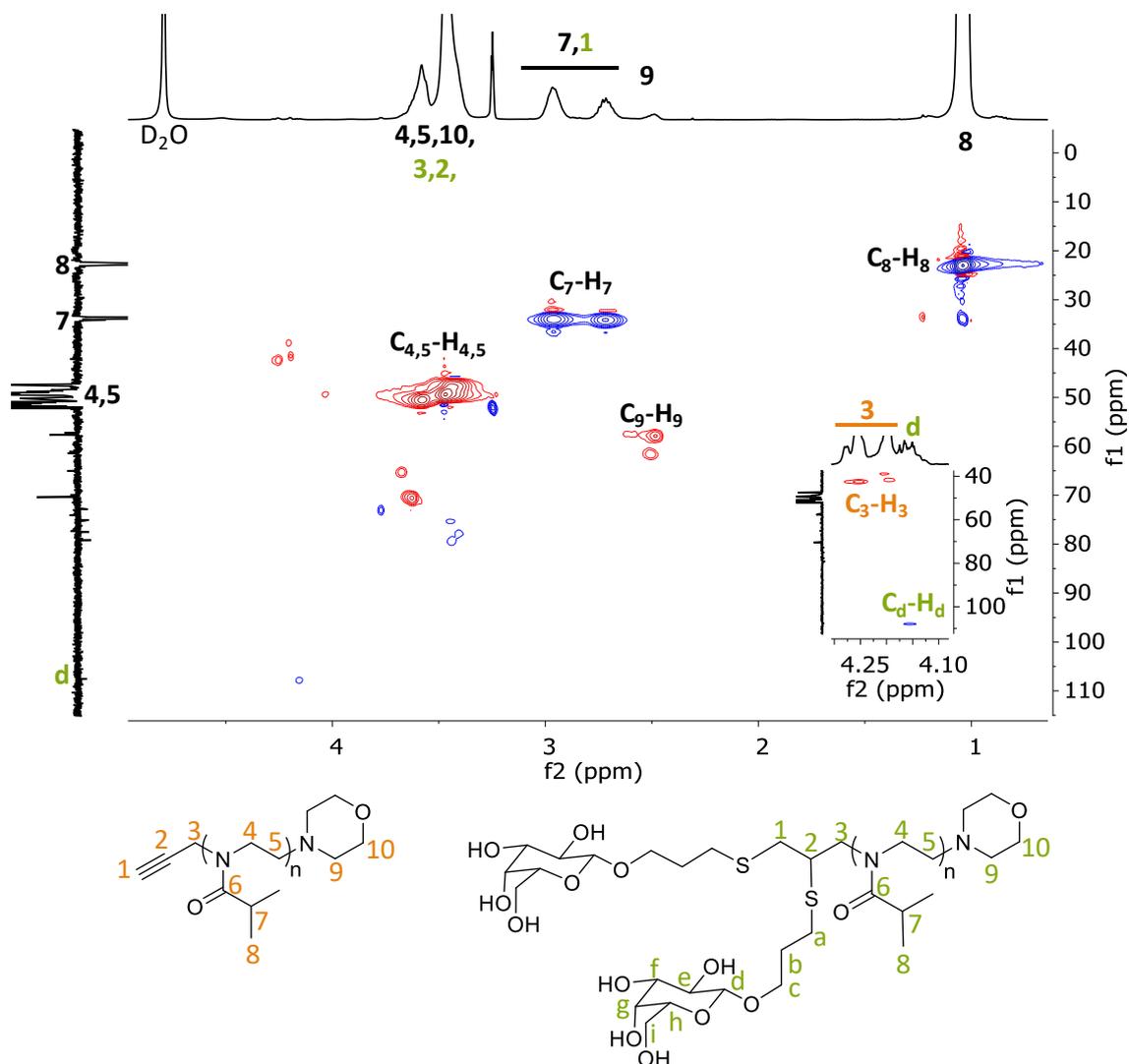


Figure III.8 : Spectre RMN HSQCed du copolymère GwD-128 dans D₂O à 20 °C.

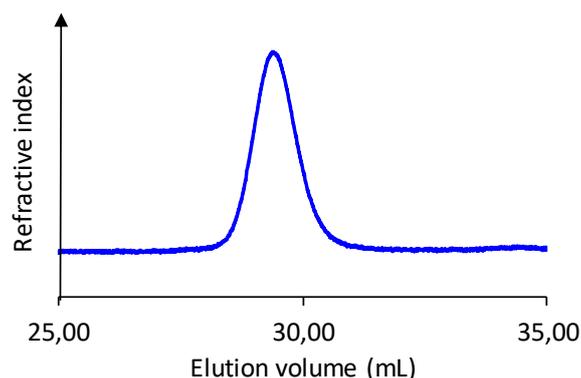


Figure III.9 : Chromatogramme par CES DMF du polymère GwD-128.

Cependant, la modification n'étant pas totale, une lampe UV plus puissante a été utilisée dans le but d'améliorer le couplage (ici, un schlenk est utilisé afin de pouvoir le placer dans l'appareil). De plus, au vu des résultats obtenus précédemment sur la fonctionnalisation des motifs EI par la HNA, cette réaction est réalisée dans l'éthanol pur. Ces changements de paramètres ont permis de multiplier par deux le taux de fonctionnalisation puisque 53 % des chaînes macromoléculaires sont fonctionnalisées.

Par conséquent, les conditions de réaction de GwD-145 réalisée dans l'éthanol avec la lampe UV 2 sont celles permettant d'obtenir le taux de couplage le plus élevé.

I.2. Modification des PiPrOx-*b*-PEI

Les fonctionnalisations des copolymères PiPrOx-*b*-PEI (H_{Px}) sont réalisées dans l'éthanol en utilisant soit la lampe UV₁ soit la lampe UV₂ (**Schéma III.7**). Divers ratios thiol/activateur/alcyne sont utilisés. Les conditions de réaction et les taux de couplage obtenus sont résumés dans le **Tableau III.7**.

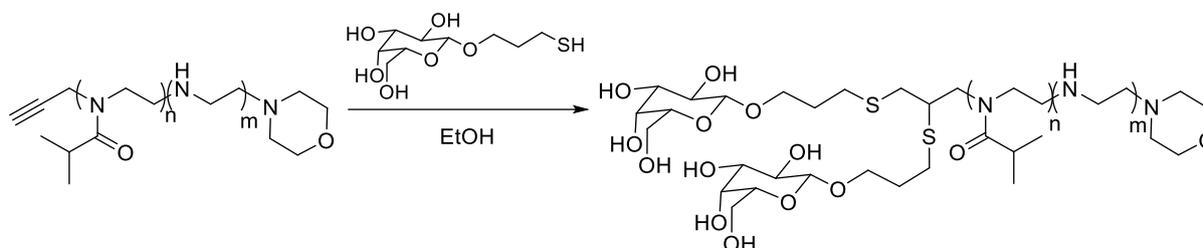


Schéma III.7 : Fonctionnalisation des H_{Px} par le 3-mercaptopropylgalactose.

Tableau III.7 : Optimisation des conditions de la modification des H_{Px} de différentes masses molaires par le 3-mercaptopropyl-β-D-galactopyranoside.

Type	Run	Polymer used	M _n th starting PEI-PiPrOx (kg.mol ⁻¹)	Eq thiol/TBHP/triple bond	[polymer] (mmol.L ⁻¹)	Method	Coupling rate (%)
H _{P5-Gal}	GwD-140			20/0.2/1	1.2	UV ₁	≈ 44
	GwD-148	SAK-4	15-5.7	20/0.2/1	1.0	UV ₂	≈ 45
	GwD-173			40/0.4/1	1.0	UV ₂	≈ 100
H _{P6-Gal}	GwD-136	GwD-121	8.9-5.7	20/0.2/1	1.1	UV ₁	0
	GwD-174			40/0.1/1	1.0	UV ₂	0
H _{P8-Gal}	GwD-141	SAK-8	4.3-5.7	20/0.2/1	1.2	UV ₁	0
	GwD-175	GwD-98	4.2-5.7	40/0.4/1	1.0	UV ₂	≈ 33

UV₁: 365 nm, 4 watts in quartz cuvette; UV₂: 300 nm, 7 × 35 Watts in glass shlenck

Dans ces expériences, l'évaluation du taux de couplage est complexe. En effet, le signal des protons en alpha de la triple liaison n'étant pas isolé sur le spectre des polymères H_{Px}, le calcul effectué précédemment ne peut être appliqué ici. Ainsi, une nouvelle méthode de calcul, présentée en **Annexe 2**, a été mise en œuvre. Cette méthode permet de calculer un taux de fonctionnalisation des extrémités de chaîne. Cependant les résultats sont assez variables d'un spectre RMN à l'autre. De plus, le signal du proton d se situant proche du signal des protons 4 et 5 des unités répétitives, son intégration est assez imprécise. Par RMN HSQC, il n'a pas été possible de mettre en évidence le couplage entre le proton anomérique et le carbone anomérique compte tenu de la masse molaire des copolymères. Aucun couplage n'apparaît sur le spectre 2D.

Néanmoins, lors des divers essais de couplage thiol-yne, et malgré le calcul de fonctionnalisation complexe, la réaction GwD-173, H_{P5-Gal}, a permis la modification totale des extrémités de chaîne. Dans le cas des polymères H_{P6} et H_{P8}, la fonctionnalisation est moins efficace, comme précédemment lors de la modification de ces mêmes polymères par la HNA.

D'autre part, les polymères H_{Px} comportant un bloc PEI cationique, ceux-ci ne peuvent être analysés en CES DMF afin de vérifier l'absence de couplage entre différentes chaînes macromoléculaires. Ce phénomène n'ayant pas été observé pour l'homopolymère PiPrOx (**Figure III.9**), on peut supposer que cette réaction ne se produit pas dans le cas présent.

Dans la suite de notre travail, notamment pour les expériences de formulation et de tests *in vitro* et *in vivo*, l'apport de la fonctionnalisation par le galactose sera évalué sur les polymères de type H_{P5}.

II. Fonctionnalisation par le dansyle

Dans un troisième temps, la fonctionnalisation des polymères par un fluorophore a été étudiée. En effet, l'incorporation de fluorophores dans des nanoparticules de polymères utilisées pour l'administration de médicament est de plus en plus développée *in vitro* et/ou *in vivo* afin de suivre le devenir des nanoparticules et de réaliser de l'imagerie de diagnostic.¹⁹ La stratégie couramment utilisée est l'encapsulation de fluorophores lors de la formation des NPs.²⁰ Cependant, cette technique a plusieurs inconvénients : la faible encapsulation de fluorophores ou encore une fuite de fluorophores hors de la nanoparticule faussant l'imagerie de fluorescence réalisée ensuite. C'est pourquoi la conjugaison covalente du fluorophore à la chaîne polymère est une stratégie promue afin de mettre au point une technologie robuste.

Ici, nous nous intéressons à un couplage covalent du fluorophore au cours de la polymérisation des poly(oxazoline)s. Deux stratégies peuvent être envisagées : soit l'amorceur porte le fluorophore soit l'agent de terminaison. Un fluorophore à base de dansyle a été choisi pour réaliser ces différentes expériences. Divers travaux mentionnent son utilisation en biologie couplé à des molécules biologiques mais également à des polymères.²¹⁻²³ Ainsi, le chlorure de dansyle sera utilisé en tant qu'amorceur de la polymérisation des oxazolines et le dansyle amide en tant qu'agent de terminaison. L'objectif de cette partie est de synthétiser des poly(2-méthyl-2oxazoline)s fonctionnalisées par un groupement dansyle.

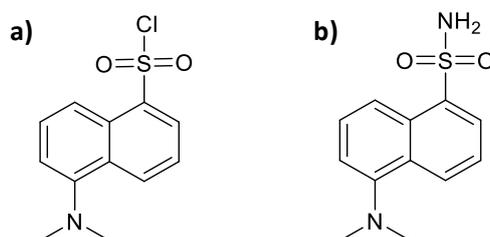


Figure III.10 : Structure du chlorure de dansyle (Ds-Cl) et du dansyle amide (Ds-NH₂).

II.1. Synthèse de polymères fluorescents

Divers polymères P_{MeOx} ont été synthétisés dans les conditions de réaction habituelles, soit dans l'acétonitrile à 80 °C par chauffage conventionnel et sous atmosphère inerte. Les

amorceurs, agents de terminaison et caractéristiques des divers polymères obtenus sont présentés dans le **Tableau III.8**.

Tableau III.8 : Conditions de réaction et caractérisations des poly(2-méthyl-2-oxazoline)s.

Run	Initiator & Quench used	Ox/I/Q	Time ¹ (h)	P ² (%)	M _n th ³ (kg.mol ⁻¹)	M _n ^{NMR} ⁴ (kg.mol ⁻¹)	M _n ⁵ SEC DMF (kg.mol ⁻¹)	D ⁵
GwD-109	Propargyl-OTs Morpholine	59/1/10	72	100	5.0	5.0	5.5	1.18
GwD-17	Allyl bromide Ds-NH ₂	47/1/10	26	98	4.3	4.3	4.5	1.33
GwD-12		35/1/10	24	62	2.0	3.3	2.8	1.29
GwD-28	Ds-Cl	35/1/10	24	-	-	9.5	2.8	1.18
GwD-166*	Piperidine	35/1/10	24	71	2.3	7.0	3.4	1.22
GwD-169*		70/1/10	72	84	5.0	15.3	6.4	1.23

I and Q correspond respectively to the initiator and quencher

[MeOx] = 1.5 M

¹ : polymerization time

² : MeOx conversion determined by ¹H NMR

³ : $M_n(th) = ([MeOx] \times M(MeOx) \times Conversion) / [I]$

* : new batch of DsCl

⁴ : determined by ¹H NMR

⁵ : SEC in DMF; PMMA standards

⁶ : functionalization in dansyl

Le fluorophore a tout d'abord été introduit via l'agent de terminaison. A l'issue de la polymérisation, le polymère GwD-17, PMeOx-Ds, a été solubilisé dans le chloroforme, puis purifié par précipitation dans le THF et caractérisé par RMN ¹H et par CES DMF (**Figure III.11**).

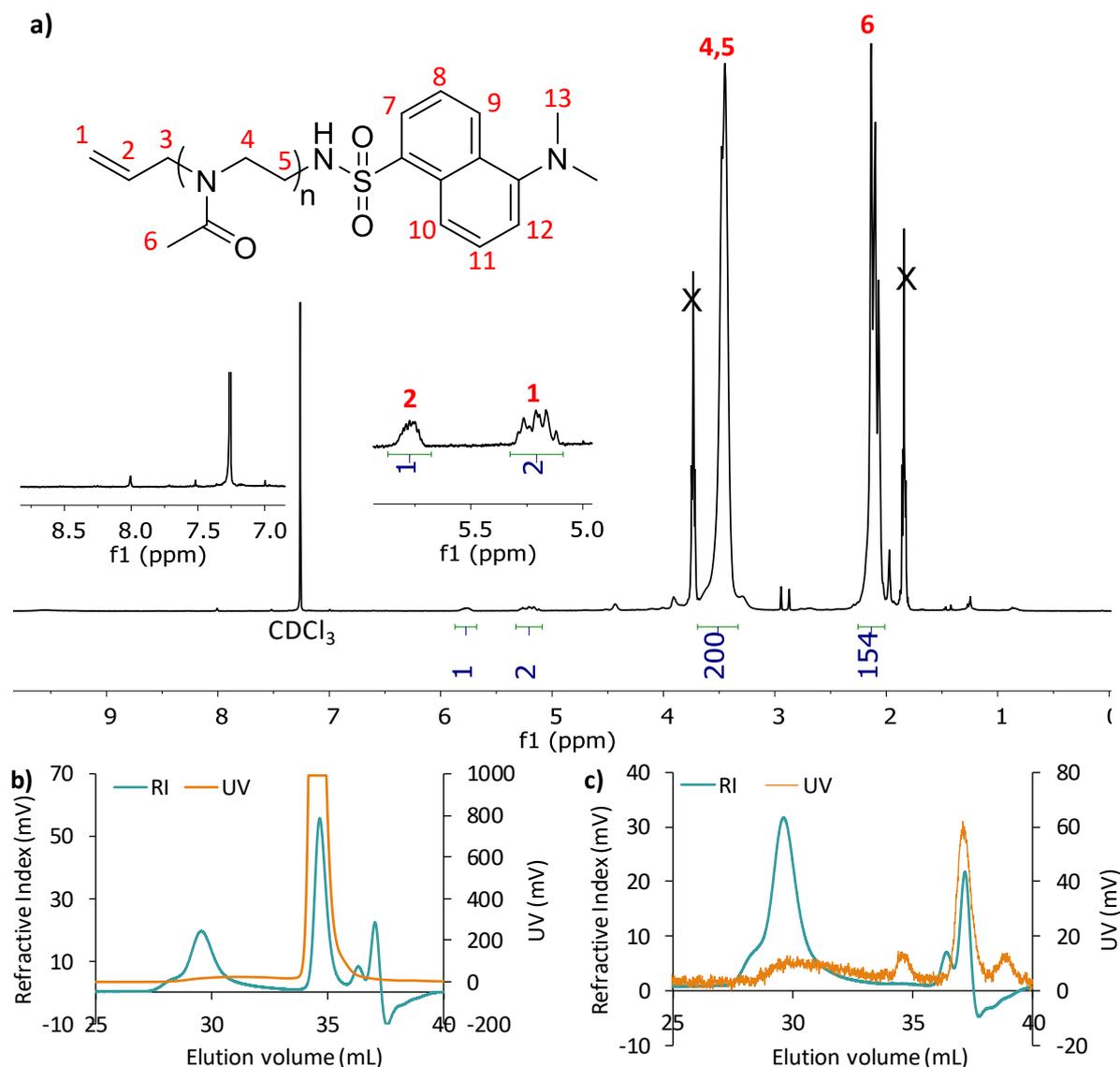


Figure III.11 : (a) Spectre RMN ¹H de GwD-17 après précipitation ; Chromatogrammes RI et UV à 254 nm par CES DMF de (b) GwD-17 brut et (c) GwD-17 précipité.

Le spectre RMN ¹H du polymère purifié donné en **Figure III.11.a** ne présente pas de signaux pouvant être attribués aux protons aromatiques du dansyle. De plus, alors que le chromatogramme CES obtenu en RI met en évidence la présence de chaînes polymère ($V_{\text{élution}} \approx 29.6$ mL), seul du dansyle libre ($V_{\text{élution}} \approx 34.7$ mL) est observé en UV (**Figure III.11.b**). Nous constatons qu'après précipitation la quasi-totalité du chromophore est éliminée (**Figure III.11.c**). Ces résultats mettent donc en évidence l'absence de fluorophore sur la chaîne macromoléculaire. Le dansyle amide ne permet donc pas de fonctionnaliser les chaînes polymère. Ce résultat peut être expliqué par une possible introduction d'eau avec l'agent de terminaison fluorescent. En effet, malgré les précautions prises (manipulation sous atmosphère inerte et séchage sous vide pendant plusieurs heures), le solide de dansyl amide reste sous forme de grains agglomérés avec un aspect humide suggérant la présence d'eau.

La stratégie « grafting from » a été ensuite étudiée en utilisant le chlorure de dansyle comme amorceur. Cette technique a permis l'obtention de divers polymères Ds-PMeOx portant un groupe dansyle en extrémité de chaîne. Le spectre RMN ^1H du polymère GwD-166 après purification est donné à titre d'exemple à la **Figure III.12**. En plus des signaux habituels, nous observons des nouveaux signaux entre 7 et 8.6 ppm que l'on attribue aux protons aromatiques du résidu dansyle et un singulet à 2.8 ppm qui correspond aux protons 1 des groupes méthyle substituant l'atome d'azote. La fonctionnalisation des chaînes polymère est également confirmée par la superposition du chromatogramme RI et du chromatogramme UV en CES du polymère GwD-28 dialysé (**Figure III.13.a**). Toutefois, afin de confirmer que le signal UV du polymère est uniquement dû à la fonctionnalisation apportée par le dansyle, un PMeOx sans fluorophore a été synthétisé (GwD-109) pour comparaison. Les chromatogrammes UV des polymères purifiés GwD-109 et GwD-28 obtenus par CES DMF sont tracés à la **Figure III.13.b**. Dans le premier cas, aucun signal UV n'est détecté à la longueur d'onde étudiée alors que, pour GwD-28-D2, une forte réponse du polymère est observée. Ainsi, le signal présent sur le chromatogramme UV de GwD-28 confirme l'amorçage de la polymérisation par le chlorure de dansyle.

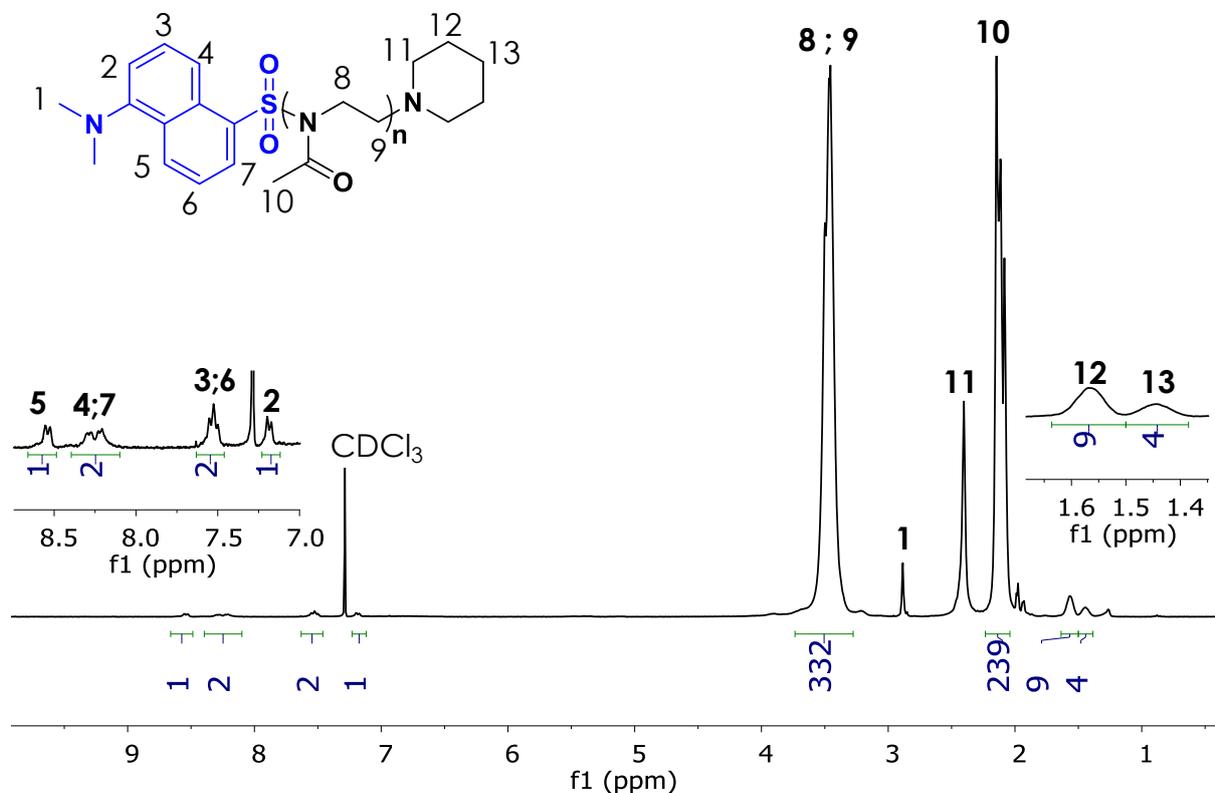


Figure III.12 : Spectre RMN ^1H de GwD-166 dans le CDCl_3 à 20 °C.

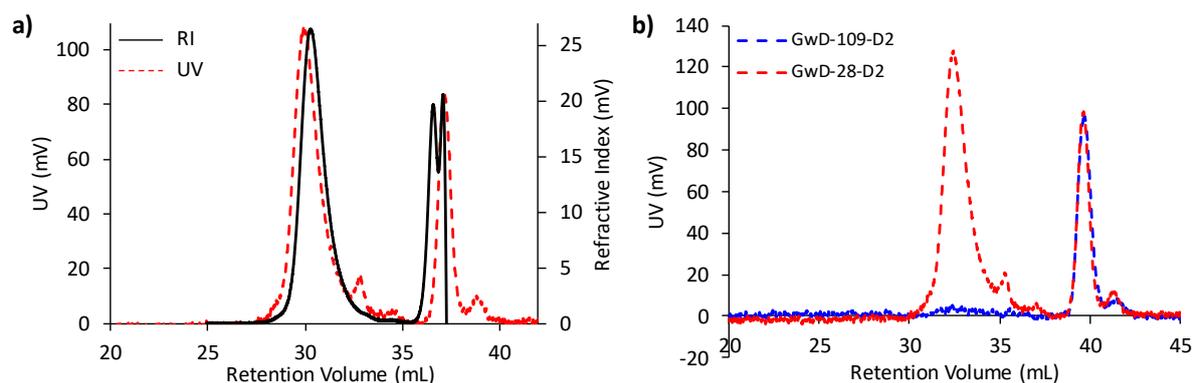


Figure III.13 : (a) Chromatogrammes UV et RI par CES DMF de GwD-28-D2 et (b) chromatogrammes UV par CES DMF des polymères GwD-109-D2 et GwD-28-D2 (UV = 254 nm).

Malgré la fonctionnalisation évidente des chaînes polymère par un groupement dansyle, nous observons systématiquement un écart entre les masses molaires théoriques des polymères et celles obtenues par CES (**Tableau III.8**), les masses molaires CES étant légèrement supérieures aux valeurs théoriques. Cet écart a été attribué à un amorçage partiel du chlorure de dansyle.

En effet, l'analyse des chromatogrammes RI et UV du polymère GwD-28 à différentes étapes de purification (**Figure III.14**) met en évidence un signal correspondant au polymère vers 30,3 mL et un signal vers 34,7 mL correspondant à des molécules de très faibles masses molaires. L'intensité de ce dernier ne décroît pas après la 1^{ère} dialyse effectuée contre l'eau, par contre disparaît totalement à l'issue de la 2nd dialyse effectuée contre du méthanol. Ce résultat montre l'efficacité de la 2nd purification, contrairement à la première. A la suite de cette expérience, seule une dialyse contre le méthanol est réalisée pour les autres polymérisations. Cette dialyse permet à la fois d'éliminer les petites molécules éluant à 34,7 mL et l'excès de pipéridine utilisée à l'étape de terminaison. Ces résultats ont été confirmés en réitérant l'expérience GwD-28 avec un lot neuf de chlorure de dansyle et en synthétisant un polymère de masse molaire plus élevée. Pour tous les polymères, nous obtenons des chromatogrammes monomodaux et symétriques avec une dispersité comprise entre 1,18 et 1,29. Ces résultats semblent indiquer un amorçage partiel, mais pas lent, car aucune trainée vers les faibles masses molaires n'est visible sur les chromatogrammes RI des polymères.

La pureté du chlorure de dansyle a été suspectée, bien que le fournisseur (ABCR) affiche une pureté de 97 %. Les 2 lots utilisés ont donc été analysés par spectroscopie HRMS. L'analyse

du 1^{er} lot a été effectuée plusieurs mois après la synthèse de GwD-12 et GwD-28, alors que l'analyse du 2nd lot a été conduite à réception du nouveau lot pour la synthèse de GwD-166 et GwD-169. Le spectre HRMS du 1^{er} lot est présenté à la **Figure III.15**, la seconde analyse étant donnée en **Annexe III.3**. Les deux analyses mettent en évidence du chlorure de dansyle cationisé par H⁺. Même si une petite fraction du chlorure de dansyle a été hydrolysée lors des manipulations, le composé hydrolysé (Ds-OH) n'est pas détecté en HRMS. En conclusion, il n'a pas été possible de déterminer la nature du composant éluant à 34,7 mL en CES, qui pourrait être responsable de l'amorçage partiel. Sur les chromatogrammes CES RI, l'air du pic à 34,7 mL représente environ 10 % de l'aire totale des pics ($\text{Aire}_{\text{pic à 34,5 mL}} / (\text{Aire}_{\text{pic à 30 mL}} + \text{Aire}_{\text{pic à 34,5 mL}})$).

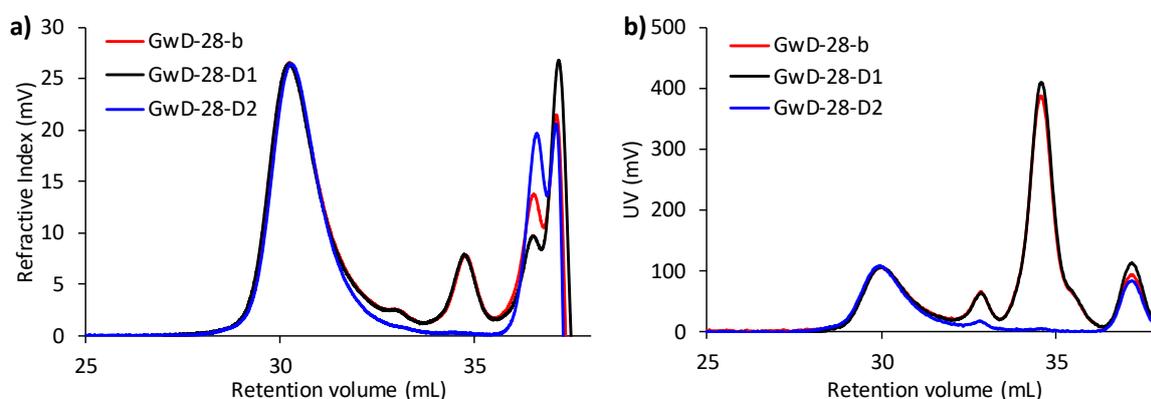


Figure III.14 : Chromatogrammes (a) RI et (b) UV par CES DMF du polymère GwD-28 à différentes étapes de purification (b = brut, D1 = dialyse 1 dans l'eau, D2 = dialyse 2 dans le méthanol).

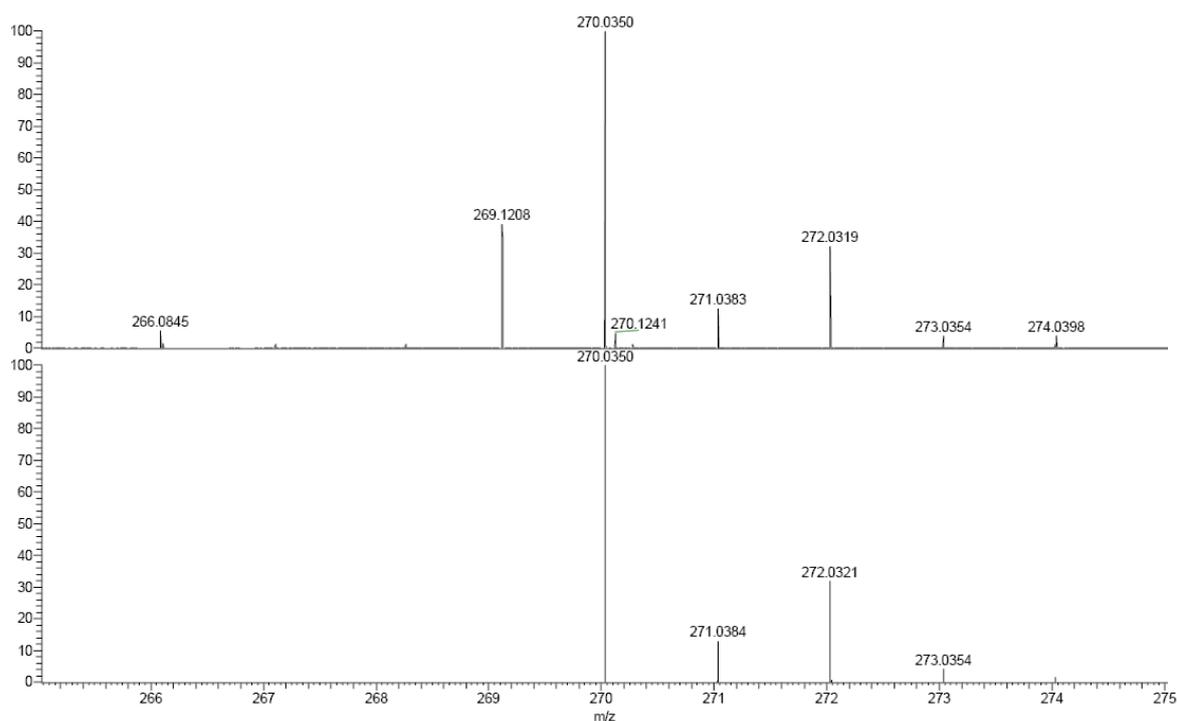
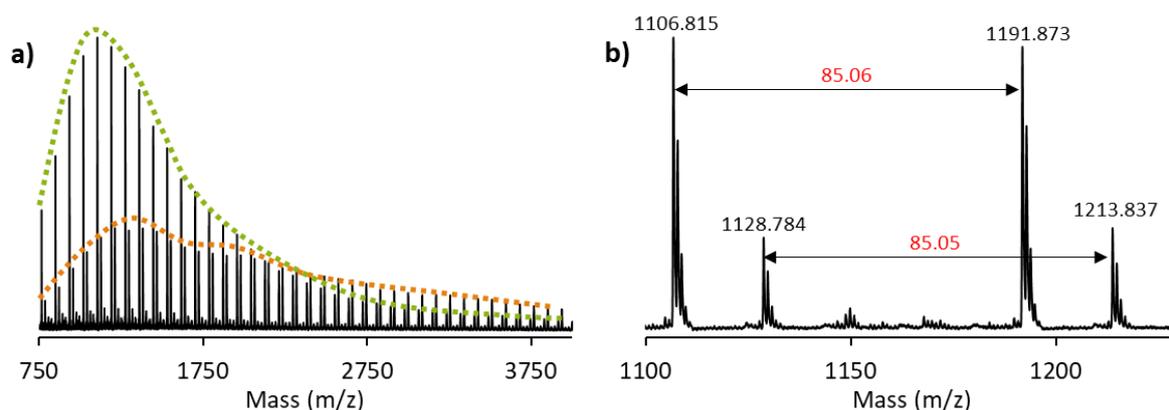


Figure III.15 : HRMS-ESI du 1^{er} lot de chlorure de dansyle à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans CH_3CN (en haut : spectre expérimental ; en bas = spectre théorique ; erreur = 0 ppm).

Pour terminer, le polymère GwD-166 a été analysé par Maldi-TOF afin de confirmer la présence d'une population amorcée par le chlorure de dansyle (**Figure III.16**). La population principale correspond à la structure attendue : le polymère fonctionnalisé par un groupe dansyle et par la pipéridine est cationisé avec Na^+ . Cependant, une population issue d'une réaction de transfert et cationisée par Na^+ apparaît. Cette analyse n'étant pas quantitative, nous ne pouvons pas déterminer la population majoritaire de l'échantillon par cette méthode, cependant, les analyses RI et UV par CES DMF montre une unique population correspondant à celle amorcée par le chlorure de dansyle et permettent, ainsi, d'affirmer que cette population est majoritaire.



X_n	9	12
Calculated exact mass	1106.613	1128.713
Structural formula		

Figure III.16 : (a) Spectre Maldi-TOF du polymère GwD-166 en mode réflectron et (b) zoom sur la zone 1100 – 1230 m/z.

Pour conclure, nous avons réussi à synthétiser différents PMeOx portant un groupement dansyle en extrémité de chaîne. Même si les masses molaires CES des polymères sont légèrement supérieures aux valeurs théoriques, la distribution des chaînes est monomodale et étroite.

II.1. Caractérisation des polymères fluorescents par spectroscopie

Il est ensuite nécessaire d'analyser ces polymères par spectroscopie afin d'évaluer leur fluorescence en vue de leur utilisation en biologie.

II.1.a. Spectroscopie UV des polymères

Dans le but de mettre au point les conditions expérimentales, les spectres d'absorption UV des polymères excités à 337 nm ont été enregistrés dans le DMF et comparés à ceux du chlorure de dansyle et du dansyle amide réalisés à la même concentration (**Figure III.17**).

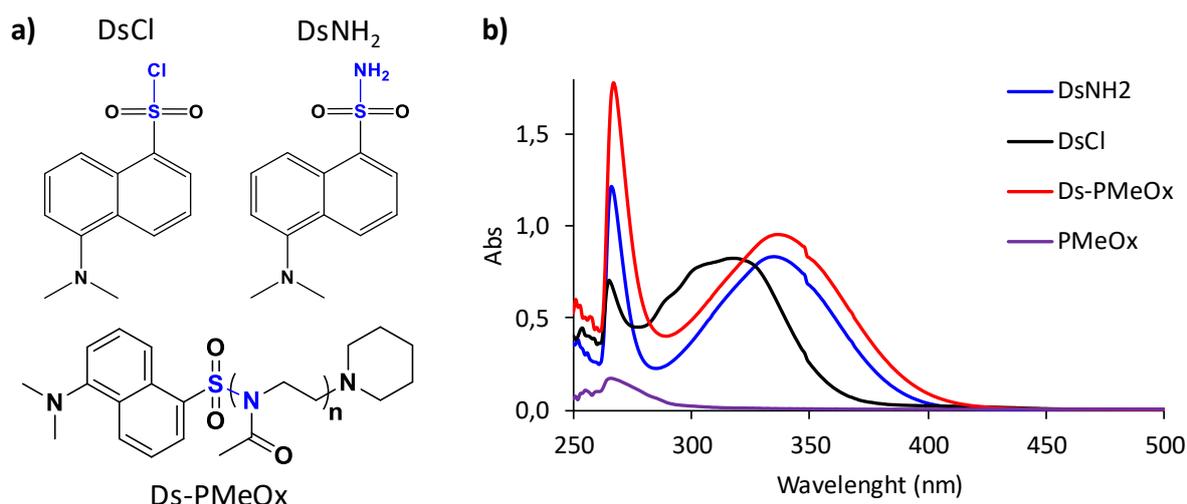


Figure III.17 : (a) Structure du chlorure de dansyle, du dansyle amide et d'une poly(2-méthyl-2-oxazoline) amorcée par du chlorure de dansyle et (b) spectres UV des molécules dansyle, d'un polymère amorcé par le dansyle (Ds-PMeOx) et d'un polymère non fluorescent (PMeOx) ($\lambda_{\text{ex}} = 337 \text{ nm}$, $C = 1,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$).

A l'inverse du PMeOx non fonctionnalisé, une absorption très nette est observée dans le cas du polymère Ds-PMeOx due à la fonctionnalisation des chaînes polymère par le fluorophore dansyle (**Figure III.17.b**). Nous constatons que l'absorption UV de Ds-PMeOx est du même ordre de grandeur que celle des fluorophores Ds-Cl et Ds-NH₂. De plus, il est intéressant de noter que le maximum d'absorption du polymère s'approche de celui du dansyle amide. En effet, si l'on examine l'extrémité du polymère portant la fonction dansyle, la liaison S-N créée s'apparente à celle présente dans le dansyle amide. Ainsi, dans la suite de notre étude, nous comparerons toujours le polymère Ds-PMeOx aux deux molécules de dansyle.

II.1.b. Spectroscopie de fluorescence des polymères

Une étude préliminaire de la fluorescence du polymère Ds-PMeOx a été réalisée. Pour cela, l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration a été analysée par spectroscopie de fluorescence (**Figure III.18**). Les données sont obtenues en relevant, à partir des spectres d'émission, l'intensité de fluorescence à $\lambda_{\text{em}} = 441 \text{ nm}$ pour le chlorure de dansyl ($\lambda_{\text{ex}} = 324 \text{ nm}$) et à $\lambda_{\text{em}} = 505 \text{ nm}$ pour le dansyle amide ($\lambda_{\text{ex}} = 333 \text{ nm}$). Un exemple est donné en **Annexe III.4** pour chaque composé à une concentration de $3,71 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$. Une évolution linéaire de la fluorescence du polymère est ainsi observée. Nous observons également que l'intensité mesurée dans le cas du polymère est inférieure à celle observée avec les molécules fluorophore (Ds-Cl et Ds-NH₂). Ce résultat est attribué à un couplage polymère-fluorophore qui modifie les propriétés de fluorescence et entraîne alors une extinction de celle-ci.

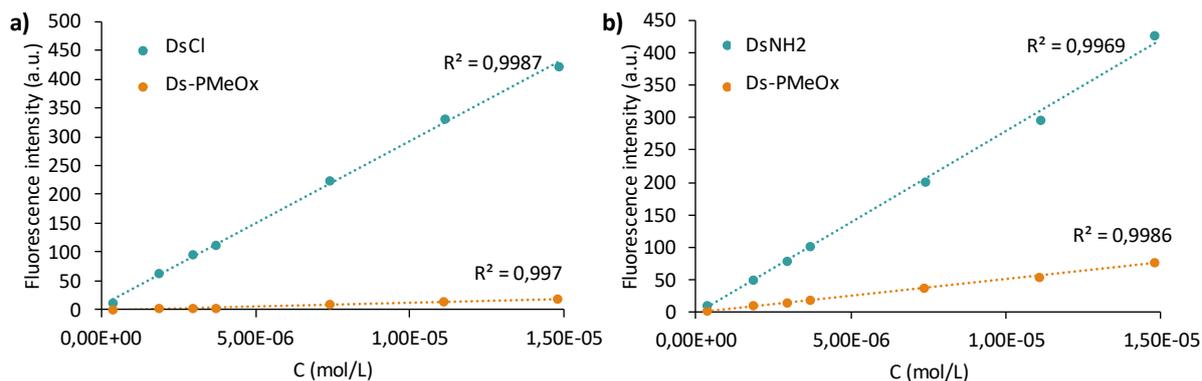


Figure III.18 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction (a) de la concentration en DsCl et Ds-PMeOx avec $\lambda_{\text{ex}} = 324$ nm et $\lambda_{\text{em}} = 441$ nm et (b) de la concentration en DsNH₂ et Ds-PMeOx avec $\lambda_{\text{ex}} = 333$ nm et $\lambda_{\text{em}} = 505$ nm.

Pour conclure, les polymères polyoxazolines fonctionnalisés par un fluorophore dansyle, Ds-PMeOx, suggèrent qu'il est possible de développer une prochaine stratégie de synthèse de polyéthylènimines fluorescentes. Ces polymères ajoutés lors de la formulation des polyplexes donneraient la possibilité de suivre le devenir des NPs lors des expériences *in vitro* et *in vivo* et notamment lors du trajet intracellulaire de l'endosome au noyau où des verrous scientifiques restent à lever. De plus, une fluorescence pertinente du polymère et une fluorescence complémentaire du plasmide permettraient de suivre le devenir de chacun.

Conclusion

Dans ce chapitre, diverses fonctionnalisations des polymères à base d'oxazoline et/ou d'éthylénimine ont été étudiées.

Tout d'abord, une fonctionnalisation par des résidus histidine dans le but d'améliorer le transfert de gènes par une augmentation du relargage de l'endosome dans le cytosol a été réalisée. Après la mise au point des conditions de synthèse du HNA et du couplage de celui-ci sur les homopolymères témoins T_{HPx} , la fonctionnalisation des polymères H_{Px} a été réalisée. Celle-ci a été concluante pour le polymère H_{P5} avec un taux de modification des unités EI compris entre 10 et 18%. Cependant, un taux de fonctionnalisation acceptable des H_{P6} et H_{P8} n'a pas été obtenu et est toujours en cours de compréhension au laboratoire.

Puis, le couplage d'un ligand de reconnaissance cellulaire en extrémité de chaîne a été investigué dans une seconde partie, le développement de thérapie ciblée étant aujourd'hui nécessaire afin d'obtenir des traitements plus efficaces tout en diminuant les effets secondaires. Une étude a, tout d'abord, été réalisée sur un homopolymère poly(2-isopropyl-2-oxazoline) dans le but de coupler deux galactoses sur l'extrémité alcyne du polymère par chimie click (couplage thiol-yne). Une fonctionnalisation de 53 % des chaînes a été obtenue sur ce modèle. En ce qui concerne la fonctionnalisation des copolymères H_{Px} , celle-ci s'est révélée plus fastidieuse dû à la transition de phase du polymère observée à haute température et à des problèmes de solubilité. La mise au point des conditions aura permis la fonctionnalisation d'environ 50 % des chaînes macromoléculaires de H_{P5} par deux molécules de galactose.

Enfin, une étude préliminaire portant sur la synthèse de polymères fluorescents pouvant être utilisés en transfert de gènes a été réalisée avec la synthèse de PMeOx fonctionnalisé en α par un groupement dansyle. L'hydrolyse de ces polymères devrait permettre l'obtention de PEI fluorescentes et ainsi la formulation de polyplexes fluorescents ouvrant la voie à des expériences d'intérêt en transfert de gènes.

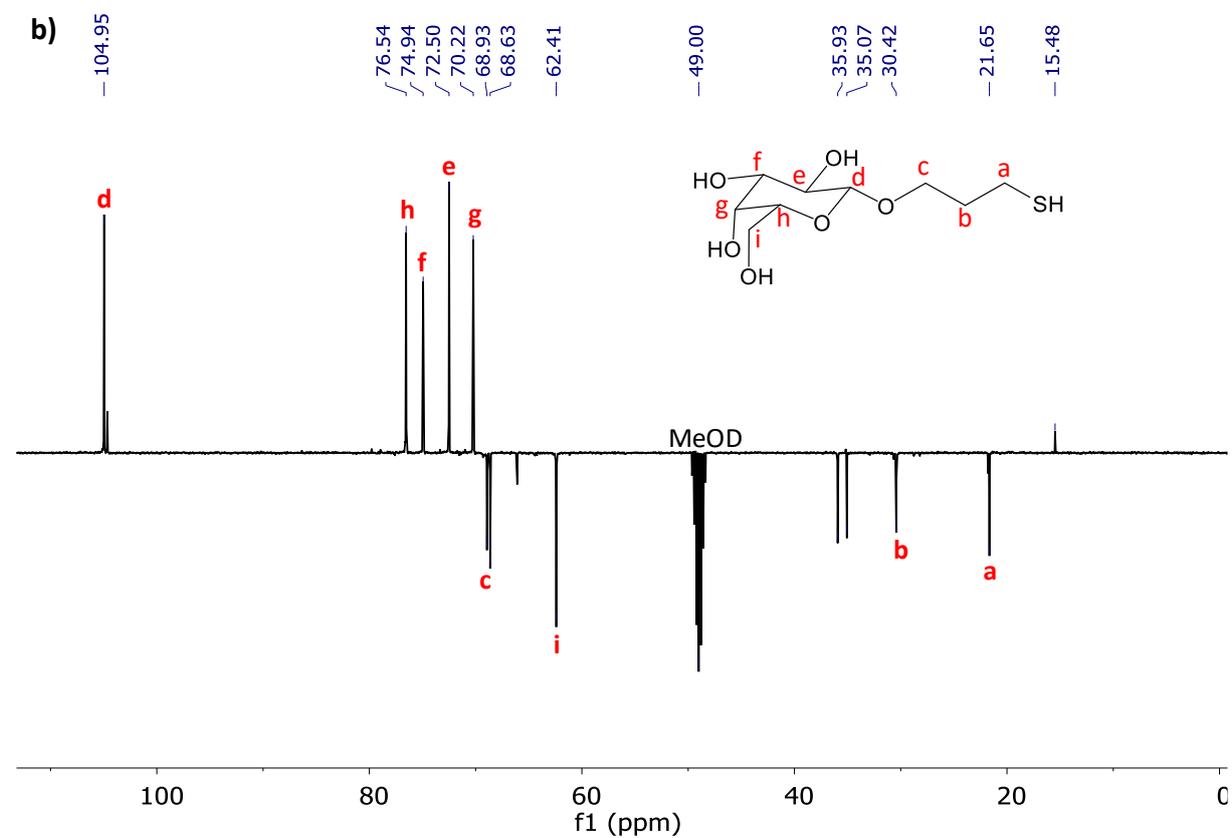
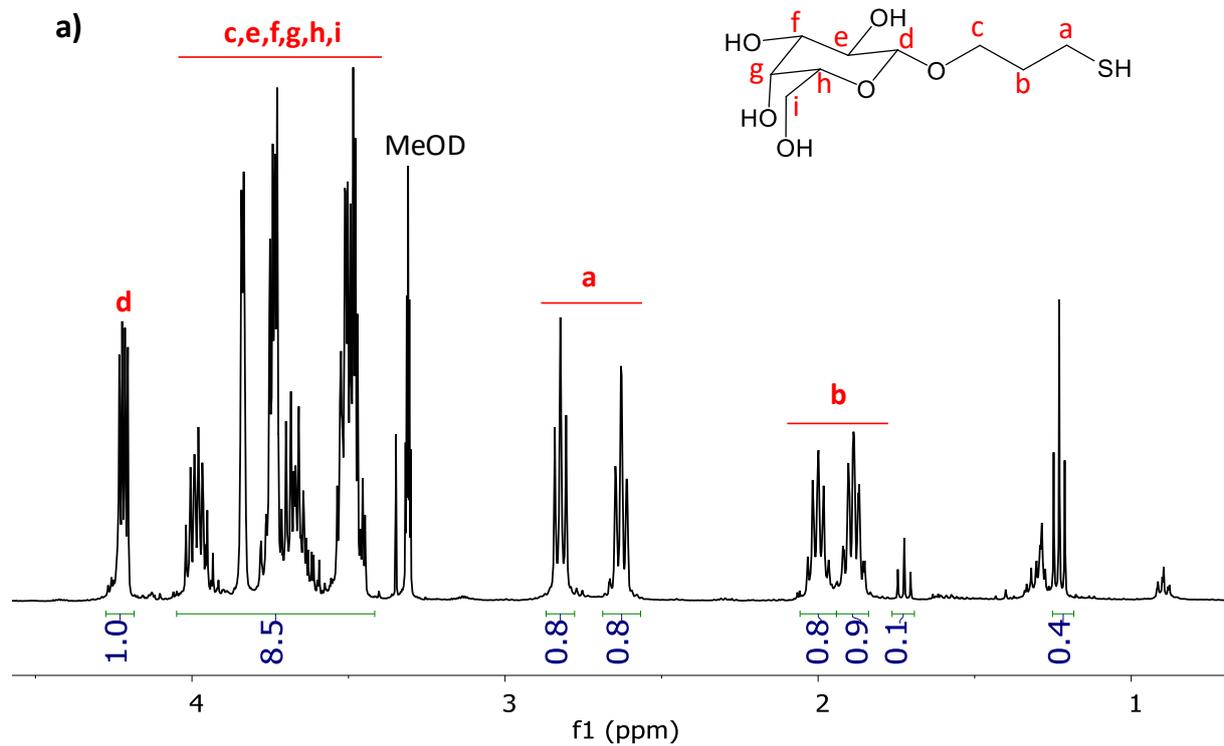
D'autre part, ces fonctionnalisations réalisées indépendamment les unes des autres auraient tout intérêt à être réalisées sur la même chaîne macromoléculaire. Une plateforme polymère polyvalente serait alors obtenue et des polyplexes de nouvelle génération pourraient voir le jour.

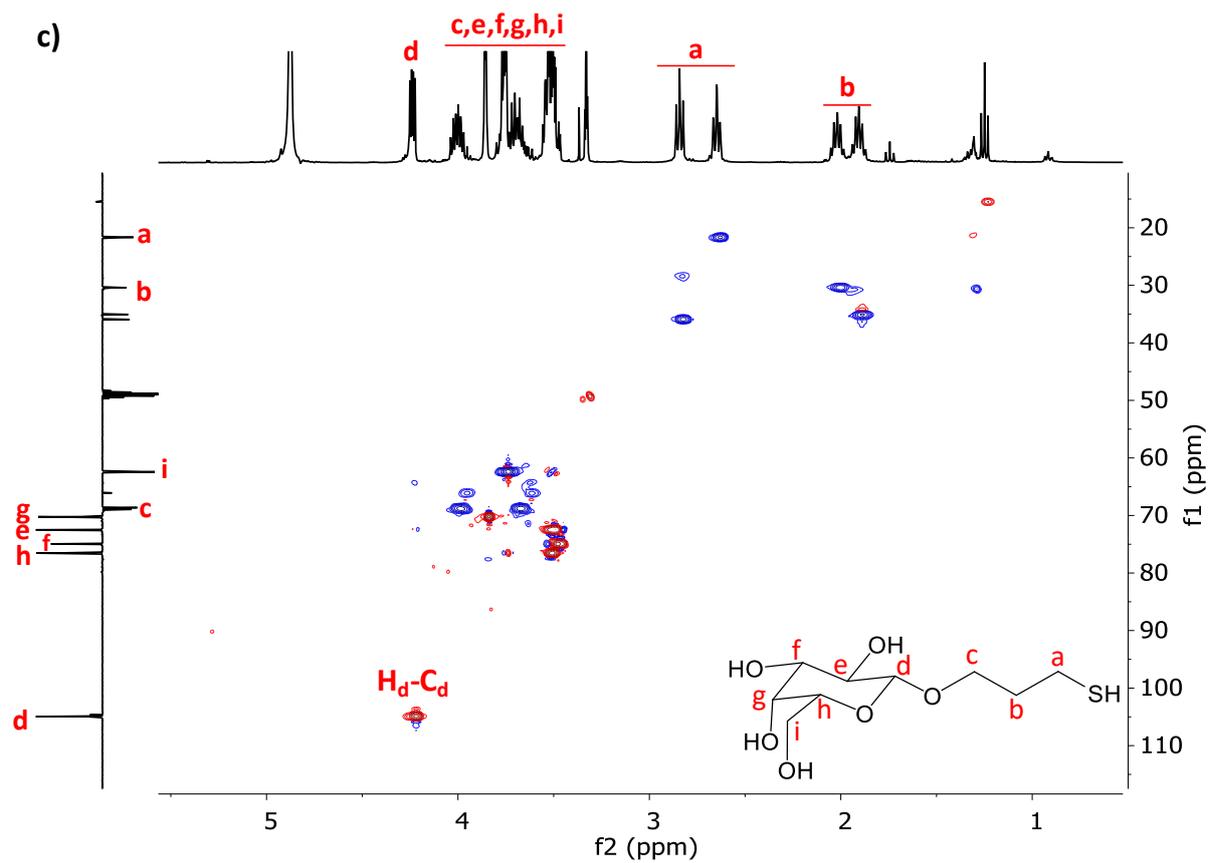
Références

- (1) Mees, M. A.; Hoogenboom, R. Full and Partial Hydrolysis of Poly(2-Oxazoline)s and the Subsequent Post-Polymerization Modification of the Resulting Polyethylenimine (Co)Polymers. *Polym. Chem.* **2018**, *9* (40), 4968–4978. <https://doi.org/10.1039/C8PY00978C>.
- (2) Delaittre, G. Telechelic Poly(2-Oxazoline)s. *Eur. Polym. J* **2019**, *121*, 109281. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109281>.
- (3) Lorson, T.; Lübtow, M. M.; Wegener, E.; Haider, M. S.; Borova, S.; Nahm, D.; Jordan, R.; Sokolski-Papkov, M.; Kabanov, A. V.; Luxenhofer, R. Poly(2-Oxazoline)s Based Biomaterials: A Comprehensive and Critical Update. *Biomaterials* **2018**, *178*, 204–280. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.05.022>.
- (4) Bertrand, E.; Gonçalves, C.; Billiet, L.; Gomez, J. P.; Pichon, C.; Cheradame, H.; Midoux, P.; Guégan, P. Histidinylated Linear PEI: A New Efficient Non-Toxic Polymer for Gene Transfer. *Chem. Commun. (Camb.)* **2011**, *47* (46), 12547–12549. <https://doi.org/10.1039/c1cc15716g>.
- (5) Guo, W.; Lee, R. J. Receptor-Targeted Gene Delivery Via folate-Conjugated Polyethylenimine. *AAPS PharmSci* **1999**, *1* (4), 20–26. <https://doi.org/10.1208/ps010419>.
- (6) Lee, Y. C.; Townsend, R. R.; Hardy, M. R.; Lönngren, J.; Arnarp, J.; Haraldsson, M.; Lönn, H. Binding of Synthetic Oligosaccharides to the Hepatic Gal/GalNAc Lectin. Dependence on Fine Structural Features. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258* (1), 199–202.
- (7) Plet, L. Synthèse de nouveaux vecteurs cationiques à architecture en étoile pour le transfert de gènes <http://www.theses.fr/s243201> (accessed Jul 29, 2020).
- (8) Boncel, S.; Saletta, K.; Hefczyk, B.; Walczak, K. Z. Michael-Type Addition of Azoles of Broad-Scale Acidity to Methyl Acrylate. *Beilstein J Org Chem* **2011**, *7*, 173–178. <https://doi.org/10.3762/bjoc.7.24>.
- (9) Villaverde, G.; Baeza, A. Targeting Strategies for Improving the Efficacy of Nanomedicine in Oncology. *Beilstein J Nanotechnol* **2019**, *10*, 168–181. <https://doi.org/10.3762/bjnano.10.16>.
- (10) Pearce, A. K.; O'Reilly, R. K. Insights into Active Targeting of Nanoparticles in Drug Delivery: Advances in Clinical Studies and Design Considerations for Cancer Nanomedicine. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (9), 2300–2311. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00456>.
- (11) Cerna, T.; Eckschlager, T.; Stiborova, M. Targeted Nanoparticles – a Promising Opportunity in Cancer Therapy – Review. *J. Metallomics Nanotechnol.* **2015**, *II* (4), 6–11.
- (12) Allen, H. J.; Karakousis, C.; Piver, M. S.; Gamarra, M.; Nava, H.; Forsyth, B.; Matecki, B.; Jazayeri, A.; Sucato, D.; Kisailus, E.; DiCioccio, R. Galactoside-Binding Lectin in Human Tissues. *TBI* **1987**, *8* (4), 218–229. <https://doi.org/10.1159/000217525>.
- (13) Ashwell, G.; Harford, J. Carbohydrate-Specific Receptors of the Liver. *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51* (1), 531–554. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.51.070182.002531>.
- (14) Huang, K.-W.; Lai, Y.-T.; Chern, G.-J.; Huang, S.-F.; Tsai, C.-L.; Sung, Y.-C.; Chiang, C.-C.; Hwang, P.-B.; Ho, T.-L.; Huang, R.-L.; Shiue, T.-Y.; Chen, Y.; Wang, S.-K. Galactose Derivative-Modified Nanoparticles for Efficient siRNA Delivery to Hepatocellular Carcinoma. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (6), 2330–2339. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00358>.
- (15) Chen, J.; Gao, X.; Hu, K.; Pang, Z.; Cai, J.; Li, J.; Wu, H.; Jiang, X. Galactose-Poly(Ethylene Glycol)-Polyethylenimine for Improved Lung Gene Transfer. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.* **2008**, *375* (3), 378–383. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.006>.
- (16) Houseman, B. T.; Gawalt, E. S.; Mrksich, M. Maleimide-Functionalized Self-Assembled Monolayers for the Preparation of Peptide and Carbohydrate Biochips. *Langmuir* **2003**, *19* (5), 1522–1531. <https://doi.org/10.1021/la0262304>.
- (17) Dey, S.; Gupta, A.; Saha, A.; Pal, S.; Kumar, S.; Manna, D. Sunlight-Mediated Thiol–Ene/Yne Click Reaction: Synthesis and DNA Transfection Efficiency of New Cationic Lipids. *ACS Omega* **2019**, *5* (1), 735–750. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03413>.
- (18) Fairbanks, B. D.; Scott, T. F.; Kloxin, C. J.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N. Thiol–Yne Photopolymerizations: Novel Mechanism, Kinetics, and Step-Growth Formation of Highly Cross-Linked Networks. *Macromolecules* **2009**, *42* (1), 211–217. <https://doi.org/10.1021/ma801903w>.
- (19) Pratiwi, F. W.; Kuo, C. W.; Chen, B.-C.; Chen, P. Recent Advances in the Use of Fluorescent Nanoparticles for Bioimaging. *Nanomedicine* **2019**, *14* (13), 1759–1769. <https://doi.org/10.2217/nmm-2019-0105>.
- (20) Xu, P.; Gullotti, E.; Tong, L.; Highley, C. B.; Errabelli, D. R.; Hasan, T.; Cheng, J.-X.; Kohane, D. S.; Yeo, Y. Intracellular Drug Delivery by Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles, Revisited. *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6* (1), 190–201. <https://doi.org/10.1021/mp800137z>.
- (21) Li, Q.; Kamra, T.; Ye, L. A Modular Approach for Assembling Turn-on Fluorescence Sensors Using Molecularly Imprinted Nanoparticles. *Chem. Comm.* **2016**, *52* (82), 12237–12240. <https://doi.org/10.1039/C6CC06628C>.
- (22) Contal, E.; S. Klymchenko, A.; Mély, Y.; Meunier, S.; Wagner, A. Core Functionalization of Polydiacetylene Micelles by a “Click” Reaction. *Soft Matter* **2011**, *7* (5), 1648–1650. <https://doi.org/10.1039/C0SM00943A>.
- (23) Chen, R. F. Dansyl Labeled Proteins: Determination of Extinction Coefficient and Number of Bound Residues with Radioactive Dansyl Chloride. *Analytical Biochemistry* **1968**, *25*, 412–416. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90116-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90116-4).

Annexes

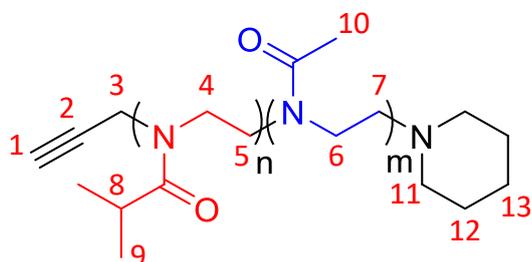




Annexe III.1 : Spectres RMN ^1H (a), ^{13}C (b) et HSQC (3) du 3-mercaptopropyl- β -D-galactopyranoside.

Annexe III.2 : Méthode de calcul du taux de fonctionnalisation des polymères H_{Px} par le 3-mercaptopropyl- β -D-galactopyranoside.

1) Copolymère PiPrOx-*b*-PMeOx

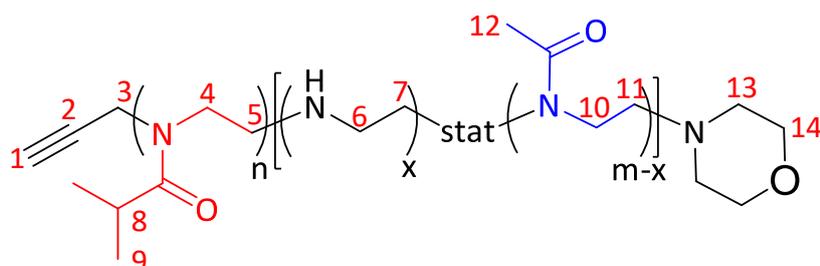


Calibration du spectre RMN 1H du polymère avec les protons 3 : $I_{H3} = 2$

➔ On relève la valeur de l'intégrale du signal corrélé aux protons 9 :

$$I_{H9, \text{ copolymère non hydrolysé}} = A$$

2) Copolymère PiPrOx-*b*-PMeOx hydrolysé



Sur le spectre RMN 1H du copolymère hydrolysé :

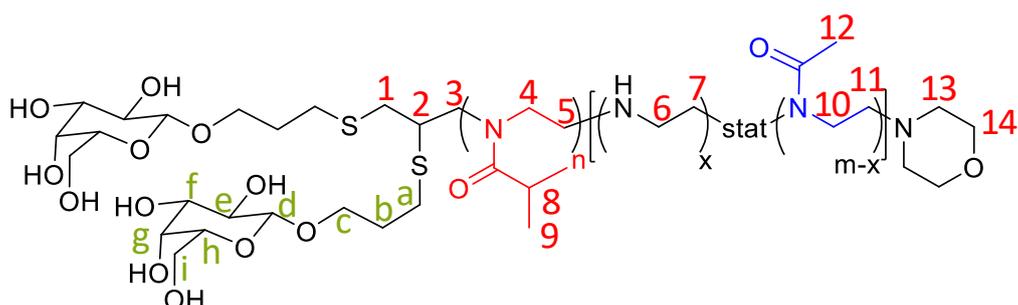
Calcul du taux d'hydrolyse des motifs iPrOx : $H_{iPrOx} = p \%$ selon l'annexe II.6.

➔ On calcule l'intégrale que devrait avoir le signal corrélé aux protons 9 si on pouvait calibrer les protons 3 à 2 (on fait l'hypothèse que l'hydrolyse n'a pas altéré la triple liaison) :

$$I_{H9, \text{ copolymère hydrolysé, th}} = A \times p \%$$

Cette valeur servira à calibrer le spectre du copolymère fonctionnalisé.

3) Copolymère Gal-PiPrOx-*b*-PMeOx

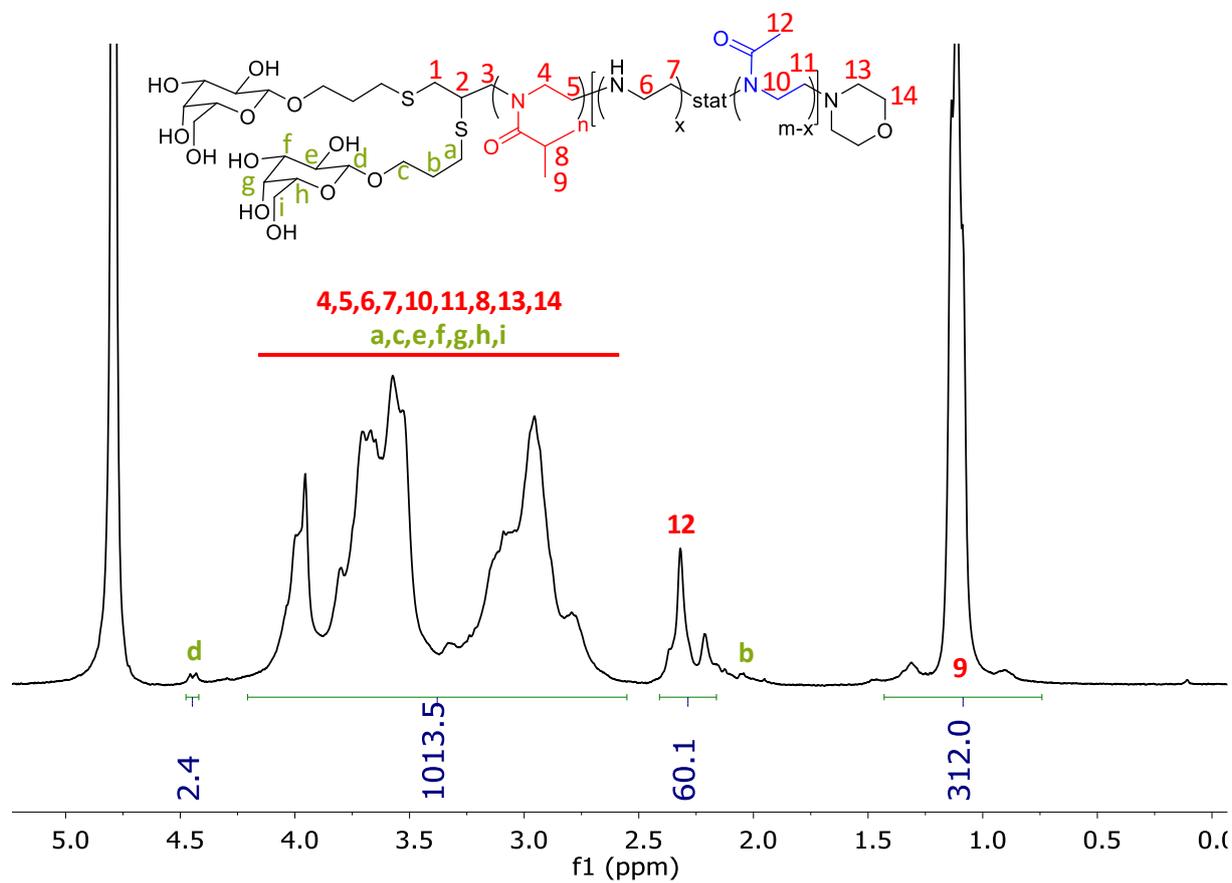


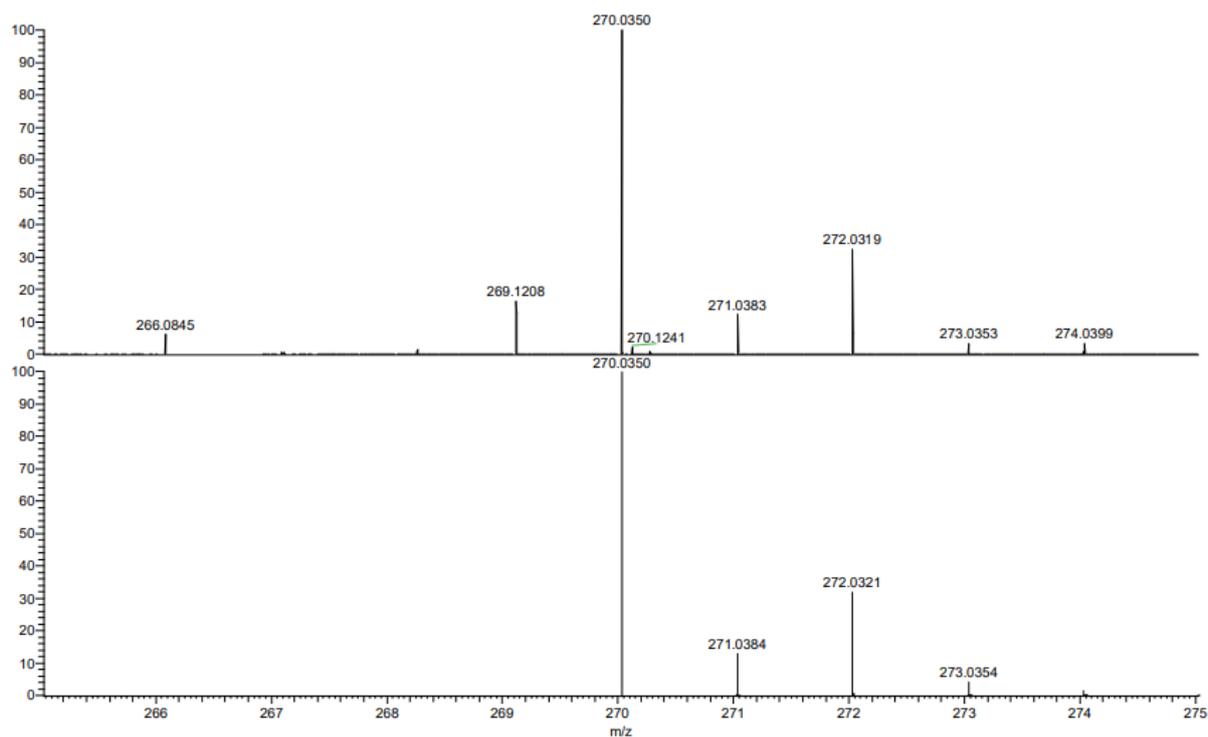
Spectre RMN ^1H du polymère fonctionnalisé :

Calibration du spectre avec I_{H9} , copolymère hydrolysé, $\text{th} = \text{A} \times \text{p} \%$

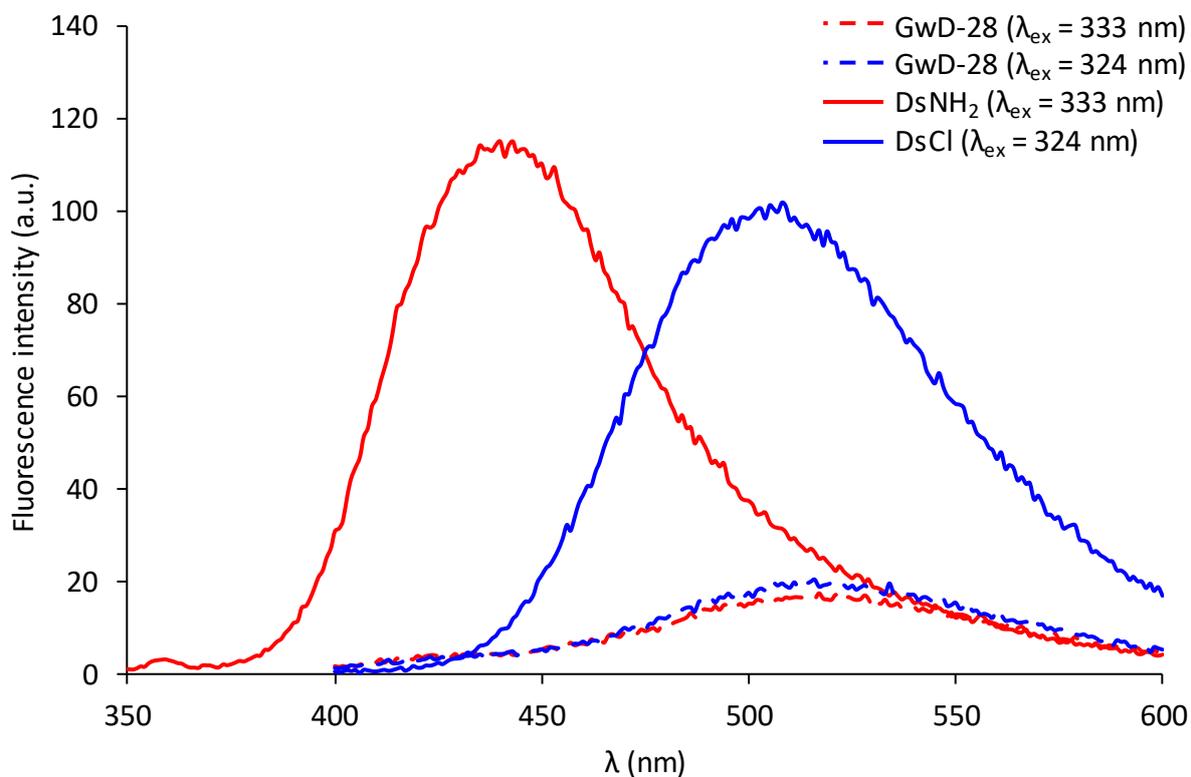
→ On relève la valeur de l'intégrale $\text{I}_{\text{Hd}} = \text{B}$

→ Calcul du taux de fonctionnalisation des chaînes polymère : $f = \text{B}/2$





Annexe III.3 : HRMS-ESI du 2^{er} lot de chlorure de dansyle à 10 µg/mL dans CH₃CN (en haut : spectre expérimental ; en bas = spectre théorique; erreur = 0 ppm).



Annexe III.4 : Spectres d'émission du polymère GwD-28 avec $\lambda_{ex} = 333$ ou 324 nm, du dansyl amide avec $\lambda_{ex} = 333$ nm et du chlorure de dansyle avec $\lambda_{ex} = 324$ nm. ($[C] = 3,76 \cdot 10^{-6}$ mol/L).

CHAPITRE 4

Formulation, caractérisation et activité
biologique des polyplexes à base de PEI et
de PiPrOx-*b*-PEI

Sommaire

Introduction	215
Partie I. Formulation des polyplexes	219
I. Formulation classique	220
I.1. Principe	220
I.2. Résultats	221
II. Formulation par extrusion	222
II.1. Principe	223
II.2. Etudes préliminaires	224
II.2.a. Quantification de la concentration en ADN p	224
II.2.b. Intégrité de la molécule d'ADN p	225
II.2.c. Evaluation de la reproductibilité	225
II.2.d. Comparaison à une formulation classique	226
II.3. Paramétrage de l'extrusion	228
II.3.a. Diamètre des pores de la membrane	228
II.3.b. Pression de l'extrusion	229
II.4. Influence du vecteur	231
II.4.a. Masse molaire du polymère	231
II.4.b. Architecture des polymères	234
II.4.c. Rapport massique polymère/ADN p	236
II.4.d. pH	239
II.5. Cryo-TEM	241
II.6. Bilan des conditions expérimentales de l'extrusion	243
Partie II. Evaluation biologique des polyplexes	247
I. Tests <i>in vitro</i>	248
I.1. Etude des polyplexes de PEI- <i>b</i> -POx et /PEI témoins	248
I.1.a. Formulation classique des polyplexes	248
I.1.b. Electrophorèse sur gel d'agarose des formulations	248
I.1.b.i. Principe	248
I.1.b.ii. Analyses des formulations classiques à partir des PEI- <i>b</i> -PiPrOx et PEI témoins	250
I.1.c. Taille et potentiel zêta des polyplexes	252
I.1.d. Stabilité des polyplexes	255
I.1.d.i. Principe	255
I.1.d.ii. Analyses des polyplexes de PEI- <i>b</i> -PiPrOx et de /PEI	257
I.1.e. Tests de cytotoxicité (MTT)	260
I.1.e.i. Principe	260

I.1.e.ii. Analyses des polymères	261
I.1.f. Tests de transfection (Test RLU)	263
I.1.f.i. Principe.....	263
I.1.f.ii. Résultats	263
I.2. Apport de la fonctionnalisation de /PEI et de PEI- <i>b</i> -PiPrOx par des greffons histidine ou galactose	265
I.2.a. Electrophorèse sur gel d'agarose	266
I.2.b. Tests de cytotoxicité	267
I.2.c. Tests de transfection	268
I.3. Comparaison formulation classique/extrusion.....	270
I.3.a. Electrophorèse sur gel d'agarose	271
I.3.b. Tests de transfection	272
II. Tests <i>in vivo</i>	274
II.1. Formulation des polyplexes par extrusion	275
II.2. Evaluation biologique des polyplexes sur souris	279
II.2.a. Mode d'administration	279
II.2.b. Principe	279
II.2.c. Résultats	280
Conclusion.....	286
Références	288
Annexes	291

Introduction

Comme présenté dans le chapitre bibliographique, les études menées jusqu'à aujourd'hui en transfert de gènes *in vitro* démontrent un bénéfice de la *l*PEI en comparaison de la *b*PEI.^{1,2} De plus, diverses fonctionnalisations chimiques ont été mises au point afin de développer des polyplexes plus efficaces notamment par l'introduction de multiples ligands cellulaires, de résidus améliorants l'effet d'« éponge à protons » nécessaire à la sortie de l'endosome ou encore le greffage de chaînes hydrophiles de type PEG afin de rendre furtifs les polyplexes.^{3,4}

Ainsi, dans ce projet, dans le but d'améliorer la transfection, de nouveaux polymères polyvalents ont été synthétisés dans les chapitres 2 et 3. Au vu des difficultés rencontrées avec la PEGylation, de nouveaux polymères hydrophiles sont étudiés afin de remplacer le PEG.⁵ Les poly(2-alkyl-2-oxazoline)s étant reconnues comme hydrophiles et biocompatibles,^{6,7} la synthèse de copolymères PEI-*b*-PiPrOx a été réalisée. Puis, leur fonctionnalisation par un ligand cellulaire de type galactose ou par de l'histidine a été réalisée. Ainsi, une bibliothèque de familles de polymères a été synthétisée : des *l*PEI (T_{H-Px}), des *l*PEI-*b*-PiPrOx (H_{Px}), des *l*PEI-*b*-PiPrOx-Galactose (H_{Px-Gal}), des *l*PEI(his) ($T_{H-Px-his}$) ou encore des *l*PEI(his)-*b*-PiPrOx (H_{Px-his}) de différentes masses molaires. L'influence de ces modifications sur la formulation des complexes avec de l'ADNp ainsi que sur l'efficacité de transfection et la cytotoxicité sont le sujet des études menées dans ce chapitre.

Dans une première partie, la formulation de polyplexes à partir de ces divers polymères et d'un plasmide sera étudiée. Afin de formuler des nanoparticules de taille inférieure à 100 nm, deux techniques de formulation seront utilisées et comparées : une formulation dite « classique » par addition d'une solution de polycation dans une solution d'ADNp sous agitation vigoureuse comme présentée dans le chapitre 1, puis une formulation dite « par extrusion » par ajout d'une solution d'ADNp *via* une membrane nanoporeuse dans une solution de polymère. Ces polyplexes seront caractérisés par DLS et cryo-TEM.

Dans une deuxième partie, les tests biologiques de ces divers polyplexes sur cellules puis sur petits animaux permettront de relier les paramètres moléculaires et physico-chimiques aux résultats biologiques.

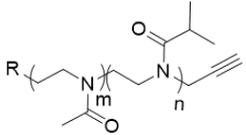
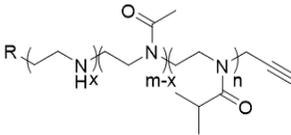
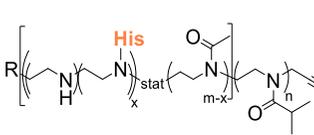
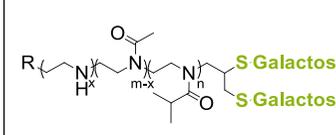
Dans ce chapitre, de nombreux polymères sont utilisés : les polymères synthétisés au cours des chapitres 2 et 3 mais également des polymères de type PEI en étoile synthétisés lors

Chapitre 4

d'une précédente étude au sein de l'équipe. La structure en étoile à 4 branches de ces polymères présente un intérêt en ce qui concerne la cytotoxicité des complexes, qui est très réduite. Deux familles de PEI en étoile ont été utilisées dans ce manuscrit : des PEI en étoile à 4 branches de masse molaire 8,1, 16,1 et 25,4 kDa, et des PEI en étoile à 4 branches de même masse molaire modifiées par l'histidine (% EI modifié = 14,0, 15,9 et 13,5 respectivement). Dans le but de simplifier la compréhension de ce chapitre, les divers polymères utilisés sont répertoriés dans le **Tableau IV.1** pour les polymères des chapitres 2 et 3 et dans le **Tableau IV.2** pour les familles de polymères en étoile. Ces deux tableaux se retrouvent également sur le document annexe fourni en feuille libre.

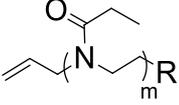
Différentes notations sont utilisées au cours de ce chapitre : M_n polymer, %PEI, WR_{polymer} , WR_{PEI} et N/P. Afin de définir chacun d'entre eux, l'**Annexe IV.1** présente ces diverses notations et les formules utilisées.

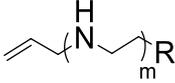
Tableau IV.1 : Caractéristiques des familles de PEI-*b*-PiPrOx et PEI synthétisées au cours des chapitres 2 et 3 et utilisés pour les tests physico-chimiques et biologiques.

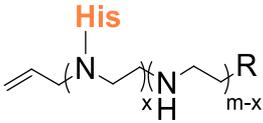
																			
		PMeOx- <i>b</i> -PiPrOx				PEI- <i>b</i> -PiPrOx				PEI(his)-PiPrOx			PEI-PiPrOx-Galactose						
Type	n° lot	Mn _{th} (kg.mol ⁻¹) (PMeOx-PiPrOx)	Mn _{SEC DMF} (kg.mol ⁻¹) (PMeOx-PiPrOx)	Type	N° lot	Mn _{th} (kg.mol ⁻¹) (PEI-PiPrOx)	Mn (kg.mol ⁻¹) PEI-PMeOx-PiPrOx	% hydrolysis (MeOx/iPrOx)	Type	N° lot	% couplé	Type	N° lot	% couplé					
Copolymers	P ₅	GwD-83	30-6	19.0-7.0	HP ₅	GwD-95 _{p6}	9.5-0.4-6.0	97.8/14.5	HP ₅ -his	SH-02	10.00	HP ₅ -Gal	GwD-140	≈ 44					
		SAK-1		19.3-6.9		SAK-4	8.6-2.0-6.9	89/0					GwD-146	18.70	GwD-148	≈ 45			
						GwD-151	9.0-1.7-6.6	90/4.4							GwD-173	≈ 100			
	P ₆	GwD-68	20-6	14.2-7.0	HP ₆	GwD-82 _{p2}	6.9-0.6-6.4	95.7/8.4	HP ₆ -his	GwD-149	4.3	HP ₆ -Gal	GwD-136	0					
		GwD-85		14.6-6.8		GwD-92	6.9-0.8-6.6	94.6/3						GwD-170	≈ 8.4	GwD-174	0		
		GwD-99		14.5-7.2		SAK-2	6.8-0.8-7.2	94.3/0											
		GwD-118		15.0-7.3		SAK-7	6.6-1-7.2	93.3/0											
		SH-01		15.0-7.3		GwD-121	6.8-1.2-7.3	92/0											
	P ₈	SAK-5	10-6	8.3-7.0	HP ₈	SAK-8	3.5-1.3-6.5	84.5/5.3	HP ₈ -his	GwD-150	4	HP ₈ -Gal	GwD-141	0					
		GwD-89		9.6-7.3		GwD-96 _{p8}	4.6-1.0-6.9	89/4.8						GwD-175	≈ 33				
						GwD-98	4.2-1.2-6.5	86/5.1											

		PMeOx				PEI				PEI(his)		
Type	n° lot	Mn _{th} (kg.mol ⁻¹)	Mn _{SEC DMF} (kg.mol ⁻¹)	Type	n° lot	Mn _{th} (kg/mol)	Mn _{SEC DMF} (kg.mol ⁻¹)	% hydrolysis	Type	N° Reaction	% Couplé	
Homopolymers	T-P ₅	GwD-84	30	21.5	T-HP ₅	GwD-132	15	11.0	T _{HP5} -his	GwD-172	11.5	
		GwD-153		21.0		GwD-158		11.0				95.9
	T-P ₆	GwD-133	20	16.9	T-HP ₆	GwD-137	10	8.7	T _{HP6} -his	GwD-154	12.8	
		GwD-157		17.3		GwD-160						
	T-P ₈	GwD-134	10	8.8	T-HP ₈	GwD-138	5	4.7	T _{HP8} -his	GwD-156	8.1	
						GwD-143-bis		4.7				95.0

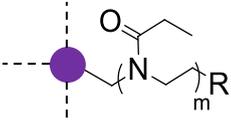
Tableau IV.2 : Caractéristiques des familles PEI linéaires et en étoile synthétisées lors d'une précédente étude dans l'équipe.

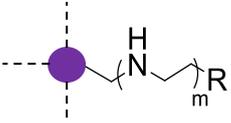


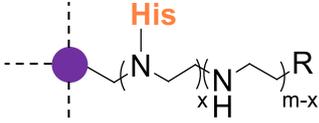




Linear polymers	PEtOx		PEI			PEI(his)	
	Run	Mn_{th} (kg/mol)	Run	Mn_{th} (kg/mol)	% hydrolysis	Type	% Couplé
	PLL97	17.6	AF2	7.6	99.4	AF7	10.6
	PLL110	36.7	PLL118	15.9	99.1	PLL131	11.4
	PLL111	58.5	PLL119	25.4	99.1	ASV4	9.4







Star polymers (4 arms)	Star PMeOx 4arms		Star PEI 4 arms			Star PEI(his) 4 arms	
	Type	Mn_{th} (kg/mol)	Type	Mn_{th} (kg/mol)	% hydrolysis	Type	% Couplé
	PLL109	18.6	PLL117	8.1	99.1	PLL123	14.0
	PLL105	37.1	PLL113	16.1	99.0	PLL125	15.9
	PLL103	58.6	PLL112	25.4	99.7	PLL130	13.5

Partie I. Formulation des polyplexes

L'objectif de cette partie est de mettre au point des conditions expérimentales permettant d'obtenir des polyplexes avec un diamètre hydrodynamique inférieur à 100 nm puis d'étudier l'influence de divers paramètres sur la taille des polyplexes obtenus. Cette approche peut être considérée comme biomimétique puisque l'on fait l'hypothèse que le paramètre de taille des virus AAV (25 nm)⁸ intervient dans les performances de transfection de ces vecteurs. Se rapprocher des diamètres des virus utilisés en transfection peut donc être considéré comme un objectif utile à l'amélioration de la qualité de transfection des vecteurs synthétisés dans ce travail.

Afin de formuler ces complexes, un ADN plasmidique, ADN_p, de type *pTG11033*, est utilisé (**Figure VI.1**). Ce plasmide codant pour le gène rapporteur (gène produisant une protéine ou une enzyme pouvant être quantifiée au laboratoire, par exemple par la mesure de la fluorescence sur un temps donné ou de l'activité enzymatique) de la protéine luciférase permettra, en présence de luciférine, l'émission d'une luminescence quantifiable à l'aide d'un luminomètre. D'une taille de 9572 paires de bases (bp) et contenant un promoteur CMV (cytomégalovirus) permettant son expression dans de nombreux types cellulaires, ce plasmide a une masse molaire de $6,34 \cdot 10^8$ g.mol⁻¹ représentative des plasmides contenant des gènes d'intérêt thérapeutique tel que le gène codant pour CFTR de 4440 bp.

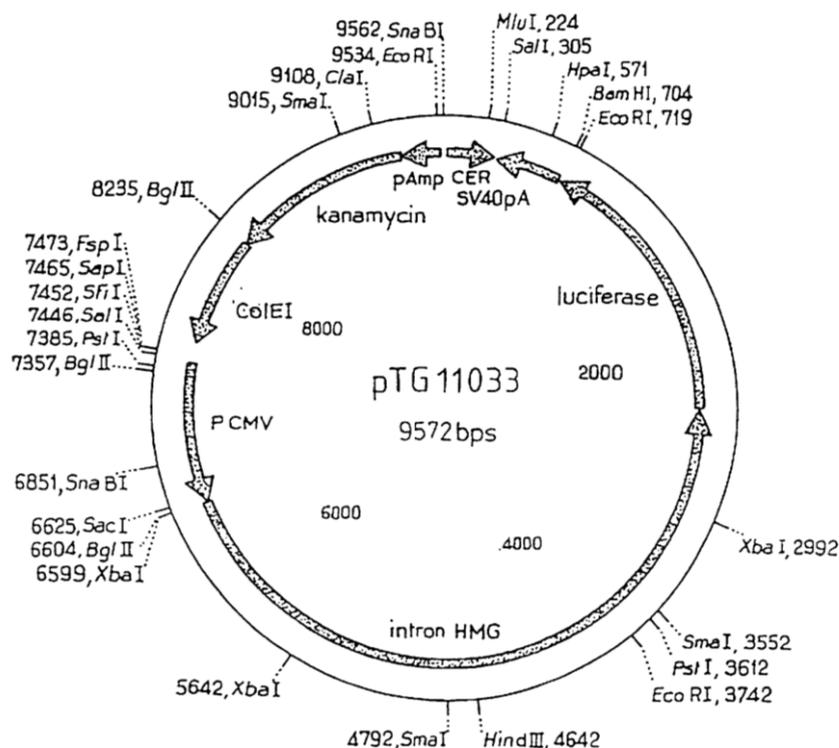


Figure VI.1 : Structure du plasmide *pTG11033*.

Lors de ce projet, deux méthodes de préparation des complexes ont été étudiées. La formulation « classique » utilisée pour les expériences *in vitro* ainsi que la formulation par « extrusion » utilisée ensuite lors d'expériences *in vitro* et *in vivo* dont le principe sera présenté ci-après.

I. Formulation classique

I.1. Principe

Dans cette étude, la formulation nommée « classique » est la technique consistant en un ajout de la solution de polymère dans la solution d'ADN*p*. Elle est utilisée dans de nombreux laboratoires.

Pour rappel, cet ajout est réalisé par une addition rapide (quelques secondes) de la solution de polymère chargé positivement dans la solution d'ADN*p* chargé négativement sous agitation rapide (vortex). Lors de ce mélange, le rapport final charges (+) / charges (-) est généralement supérieur à 1 afin de complexer toutes les molécules d'ADN*p* présentes en solution. Lors de l'ajout d'un polyélectrolyte positif dans une solution de polyélectrolyte négatif, il y a d'abord un défaut de charge positif, puis un excès une fois l'ajout terminé. Cette addition implique le passage par l'électroneutralité (rapport de charge (+)/(-) = 1) engendrant

alors une potentielle précipitation/aggrégation des complexes formés⁹). Néanmoins, avec une agitation rapide permise par le vortex et un ajout de quelques secondes, l'aggrégation des complexes entre eux menant à la précipitation, phénomène lent, peut être maîtrisée. D'autre part, les polyplexes sont des systèmes dynamiques et des réorganisations ont lieu,¹⁰ ainsi, après la formulation, un temps d'équilibration de 30 min est respecté avant toute analyse ou utilisation pour des tests biologiques.

I.2. Résultats

Afin de réaliser les tests de transfection des polymères synthétisés, diverses conditions doivent être respectées notamment la concentration. Lors de tests *in vitro*, les formulations sont réalisées à faible concentration en ADN_p (50 µg.mL⁻¹). En ce qui concerne les tests *in vivo*, comme présenté dans le chapitre 1, une concentration de l'ordre de 500 µg.mL⁻¹, proche de la concentration C* (concentration limite d'interpénétration des macromolécules), doit être respectée. La formulation classique de complexes à ces deux concentrations a été réalisée avec un polymère de /PEI fonctionnalisé à 11,4 % par des résidus histidine (PLL-131). Une solution de polymère est alors ajoutée à une solution d'ADN_p sous agitation en respectant les conditions de concentration et de rapport de charges du **Tableau IV.3**. Les résultats obtenus par DLS sont également présentés dans ce tableau.

Tableau IV.3 : Paramètres et analyses DLS de formulations classiques à deux concentrations à partir d'une PEI(his).

Run	DNA solution		Polymer solution				[DNA] _{th} mg.mL ⁻¹	Polymer/DNA			DLS analysis		
	[DNA] ¹ µg.mL ⁻¹	V mL	PEI polymère kg.mol ⁻¹	M _n polymère kg.mol ⁻¹	%PEI ³ [Polymer] mg.ml ⁻¹	V mL		WR ⁴ polymer	WR ⁵ PEI	N/P ⁶	D _{H n} ⁷ (nm)	D _{H i} ⁸ (nm)	PDI
GwD-F-27	71.4	0.56	PLL-131	25.7	0.62	0.5	0.05	3	1.9	14	154	217	0.11
GwD-F-28	714						5	0.5				precipitation	

Solvent for DNA and polymer solution: Hepes 10 mM

¹ DNA used = pTG11033

² $M_n \text{ polymer} = M_n \text{ PEI, th} \times (1 + \% \text{HNA} \times 232.2 / 43) + M_n \text{ PiPrOx th}$

³ $\% \text{PEI} = M_n \text{ PEI th} / M_n \text{ polymer}$

⁴ $\text{WR}_{\text{polymer}} = \text{mass of polymer} / \text{mass of DNA}$

⁵ $\text{WR}_{\text{PEI}} = \text{mass of polymer} \times \% \text{PEI} / \text{mass of DNA}$

⁶ $\text{N/P} = \text{moles of EI}_{\text{total}} / \text{moles of phosphate}$

$\text{EI}_{\text{total}} = \text{EI}_{\text{unmodified}} + \text{EI}_{\text{modified by HNA}}$

⁷ $\text{D}_{\text{H n}} = \text{D}_{\text{H}}$ obtained by DLS in number

⁸ $\text{D}_{\text{H i}} = \text{D}_{\text{H}}$ obtained by DLS in intensity

L'analyse des polyplexes formulés à basse concentration (50 µg.mL⁻¹ en ADN_p) montre des nanoparticules de 154,4 nm en nombre (217,3 nm en intensité). La solution est stable et homogène. Cependant, à haute concentration (500 µg.mL⁻¹ en ADN_p), une précipitation est observée : les polyplexes ne sont pas stables en solution et sédimentent.

Cette limite est imposée par le diagramme de phase et le passage par l'électroneutralité. Cette zone est dépassée lors de l'ajout du volume total de la solution de polymère permettant un excès de charges positives. A faible concentration, l'agrégation de plusieurs polyplexes entre eux est peu fréquente car la concentration C^* en ADN p n'est pas atteinte et les molécules de plasmide en solution sont relativement éloignées. Lors de l'ajout supplémentaire de polymère (excès de charges positives), la charge positive de surface permet une répulsion des complexes entre eux. A haute concentration, de l'ordre de C^* , l'agrégation de polyplexes entre eux est plus fréquente lors du passage à l'électroneutralité et la redispersion moins favorisée entraîne alors une sédimentation des agrégats formés.

Ainsi, la formulation « classique » sera utilisée lors de la formulation de polyplexes pour les analyses *in vitro* nécessitant de faibles concentrations en ADN p : l'hypothèse est faite que la discrimination de vecteurs à ces concentrations dépend peu du mode de formulation. Pour les concentrations de l'ordre de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, une autre technique permettant de formuler une solution stable de nanoparticules PEI/ADN p d'environ 100 nm à haute concentration doit être développée afin d'entreprendre des tests *in vivo*.

II. Formulation par extrusion

Dans le but de formuler des polyplexes à haute concentration en ADN p , l'ajout de la solution d'ADN p dans la solution de polymère pour contourner la zone d'électroneutralité du diagramme de phase est envisagé. L'addition simple a déjà été tentée par différents groupes de biologistes, et il est reconnu que les nanoparticules issues de ce mode de formulation ne donnent pas de résultats positifs en transfert de gènes.¹¹ Une nouvelle technique de formulation est utilisée, inspirée de différents processus biologiques notamment de la translocation des molécules biologiques à travers les pores nucléaires^{12,13} : il s'agit d'ajouter chaque molécule de plasmide, une par une, dans une solution concentrée de polymère cationique afin de formuler de façon indépendante chaque plasmide en une nanoparticule de façon consécutive. La maîtrise de cette addition nécessite une compartimentation des solutions, et une entrée de chaque plasmide un à un dans la solution de polymère par une « porte », nanopore, n'autorisant le transfert de molécules que dans un seul sens. L'hypothèse est faite qu'une fois formulées, les nanoparticules n'interviennent plus dans le processus de formulation. La concentration effective de plasmide impliquée dans la formulation est donc celle en sortie du pore, et donc naturellement inférieure à C^* .

II.1. Principe

L'addition des molécules d'ADN p une à une dans la solution de polymère est permise par extrusion des ADN p à travers une membrane composée de nanopores de diamètre calibré (entre 30 et 100 nm). Bien que le volume hydrodynamique des molécules d'ADN p soit supérieur au diamètre des nanopores, la translocation est autorisée par déformation des macromolécules sous flux. Les macromolécules sont capables de passer à travers les nanopores sans être dégradées. Pour permettre leur passage, une pression est appliquée dans le compartiment contenant la solution d'ADN p . Il a été démontré, par le modèle de succion de P. G. de Gennes,¹³ que cette translocation dépend uniquement de la pression et non de la masse molaire de l'ADN p (ou de son volume hydrodynamique) ou de la taille du pore. Ainsi, la formulation par extrusion des molécules d'ADN p une par une dans une solution de polymère cationique grâce à une membrane nanoporeuse est proposée ici.

L'extrudeuse utilisée dans le cadre de cette étude et un schéma de celle-ci sont présentés en **Figure IV.2**.

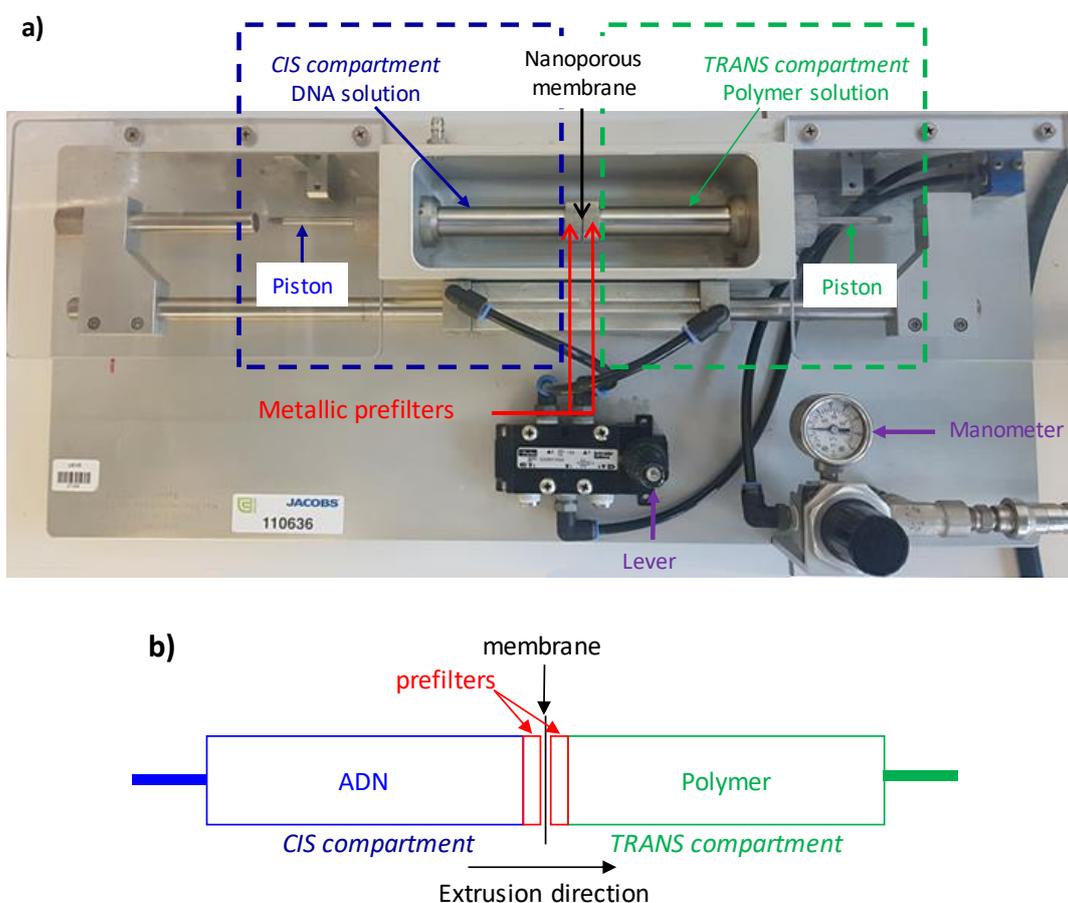


Figure IV.2 : Système d'extrusion utilisé pour les formulations : (a) photo de l'extrudeuse et (b) schéma.

L'appareil est constitué de deux compartiments nommés *Cis* et *Trans*. Le premier contient la solution d'ADN p et le second la solution de polymère. La communication entre ces deux compartiments est assurée par un ensemble de pores parallèles traversant une membrane en polycarbonate (membrane Nucléopore®). La membrane nanoporeuse contenant des pores de 30, 50 ou 100 nm est placée entre deux pré-filtres métalliques poreux (pores non visibles à l'œil nu de diamètre inconnu) dans le but de protéger la membrane d'une pression pneumatique contrôlée par un manomètre sur le piston *Cis*. La solution d'ADN p est alors extrudée à travers la membrane vers la solution de polymère.

II.2. Etudes préliminaires

Cet instrument étant peu connu, diverses formulations ont été effectuées afin de le prendre en main. Tout d'abord, une étude concernant la quantification de l'ADN p transloqué a été réalisée ainsi que des tests de reproductibilité. La résistance de l'ADN p à de tels flux a pu ainsi être mise en évidence.

II.2.a. Quantification de la concentration en ADN p

L'ADN p contenu dans la solution finale du polyplexe est quantifié par un nanodrop (Nanodrop™ One^C Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). La concentration en ADN p est déterminée en mesurant l'absorption de la solution à 260 nm, puis en exploitant la loi de Beer-Lambert et une courbe de calibration établie au préalable à partir de solutions d'ADN p de différentes concentrations. Des précédents tests effectués au sein de l'équipe ont montré que l'ADN p seul en solution ou extrudé et complexé à de la /PEI ont une absorption identique. La présence de polymère dans la solution n'interfère donc pas dans la mesure.¹⁴

Néanmoins, il est important de noter que l'utilisation de polymères modifiés par des résidus histidine pourra induire une erreur dans l'évaluation de la concentration en ADN p , suite à l'absorption des cycles imidazole à 260 nm. D'autre part, des volumes morts au niveau des préfiltres (*cis* + *trans*) estimés à 230 μ L induisent une diminution de la concentration finale en ADN p en comparaison à la valeur théorique. Dans le but de réduire cette erreur, le préfiltre correspondant au compartiment *cis* peut être placé dans la solution d'ADN p préalablement à l'extrusion. Néanmoins, le coût très élevé de la production du plasmide ne permet pas de se placer dans ces conditions idéales. Le préfiltre *cis* est donc placé dans une solution d'Hepes 10 mM et le préfiltre *trans* dans la solution de polymère. Ce protocole permet de complexer les

molécules de plasmide, une par une, dès la sortie de la membrane en polycarbonate, mais ne résout pas le problème du volume perdu en ADN p .

II.2.b. Intégrité de la molécule d'ADN p

Lors des expériences de formulation par extrusion, la macromolécule d'ADN d'un rayon de giration d'environ 300 nm dans le cas du p TG11033 (Chapitre 1) doit s'étirer afin de passer à travers les pores de la membrane d'un diamètre de 30 à 100 nm. La question de l'intégrité de la molécule d'ADN p en sortie de pore se pose donc.

Afin de vérifier que l'ADN p extrudé n'est pas altéré lors du passage dans le nanopore, une expérience de transfection avec de l'ADN p extrudé en comparaison à de l'ADN p non extrudé a été réalisée.

Pour cela, de l'ADN p a été extrudé à travers une membrane de 30 nm dans une solution d'Hepes 10 mM. Les complexes réalisés par formulation classique avec cet ADN p et son homologue non extrudé ont été testés *in vitro* à un rapport polymère/ADN p de 3/1 et à une concentration en ADN p de 0,05 mg.mL⁻¹. Des efficacités de transfection similaires ont été obtenues démontrant que la molécule d'ADN p n'est pas altérée lors de l'extrusion.

II.2.c. Evaluation de la reproductibilité

Cette technique de formulation étant peu connue, il est nécessaire de connaître la reproductibilité des formulations. Par la suite, divers paramètres seront modifiés dans le but de connaître leur influence sur les complexes formés, ainsi la déviation non significative entre deux formulations doit être évaluée.

Diverses extrusions ont été réalisées en duplicata ou triplicata. L'objectif est de s'intéresser à la reproductibilité des formulations en déterminant l'écart type entre les tailles des polyplexes obtenus dans une série d'extrusions donnée. Un diamètre hydrodynamique moyen a été déterminé par 3 mesures de DLS successives sur une formulation donnée. Puis, avec des extrusions identiques, l'écart type des diamètres hydrodynamiques a été calculé. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau IV.4**. Dans cette étude, les formulations sont réalisées avec des polymères de /PEI(his) comportant un bloc PEI de 15,9 kg.mol⁻¹ ou des PEI en étoile de masse molaire de 25,4 kg.mol⁻¹. Des membranes en polycarbonate contenant des pores de 30, 50 ou 100 nm ont été utilisées en appliquant une pression de 1 ou 2 bars.

Tableau IV.4 : Evaluation de la reproductibilité des formulations par extrusion d'ADN_p dans une solution de *star*PEI (PLL112) ou *l*PEI(his) (PLL131).

Run	DNA solution		Polymer solution				Extrusions parameters			Polymer/DNA			DLS analysis		
	[DNA] ¹ μg.mL ⁻¹	V mL	PEI %	PEI ² [polymer] mg.mL ⁻¹	V mL	Ø nm	P bar	[DNA _{trans}] th mg.mL ⁻¹	WR ³ polymer	WR ⁴ PEI	N/P ⁵	D _{H n} ⁶ (nm)	D _{H i} ⁷ (nm)	PDI	
PLL-FE20 PLL-FE20Bis	71.4	0.56	PLL 112	100	0.5	0.24	50	2	0.05	3	3	23	69 61	201 189	0.21 0.26
Standard deviation												4.0	6.0		
PLL-FE21 PLL-FE21bis GwD-F-02	71.4	0.56	PLL 112	100	0.5	0.24	100	2	0.05	3	3	23	82 82 79	174 205 203	0.24 0.23 0.22
Standard deviation												1.3	14.2		
GwD-F-61 GwD-F-99	393	0.56	PLL 131	62	6.5	0.24	30	1	0.28	4.4	2.7	23	129 135	207 220	0.16 0.19
Standard deviation												3.0	6.5		
Mean standard deviation												2.8	8.9		

Solvent for DNA and polymer solution: Hepes 10 mM

¹ DNA used = pTG11033² %PEI = $M_{n\ PEI\ th} / M_{n\ polymer}$ ³ WR_{polymer} = mass of polymer / mass of DNA⁴ WR_{PEI} = mass of polymer × %PEI / mass of DNA⁵ N/P = moles of EI_{total} / moles of phosphate⁶ D_{H n} = D_H obtained by DLS in number⁷ D_{H i} = D_H obtained by DLS in intensity

Ces formulations sont effectuées des jours différents, par des opérateurs différents (PLL = Laetitia Plet, GwD = Gwendoline Delecourt). Les analyses DLS conduisent à des tailles de polyplexes très proches dans le cas d'extrusions réalisées dans les mêmes conditions. Sur l'ensemble des expériences, les écarts types des diamètres hydrodynamiques sont inférieurs à 5 nm si on se réfère aux mesures en nombre et sont inférieures à 10 nm si on se réfère aux mesures en intensité. Ainsi, une bonne reproductibilité est obtenue lors de la formulation des complexes par extrusion quel que soit l'opérateur, le polymère, ou encore la concentration en ADN utilisée. Dans la suite de l'étude, les analyses par DLS en nombre seront principalement retenues. Au vu des résultats obtenus ci-dessus, nous estimerons donc que le paramètre étudié est déterminant dans la formulation des polyplexes si les diamètres hydrodynamiques en nombre diffèrent de plus de 5 nm.

II.2.d. Comparaison à une formulation classique

La formulation par extrusion a pour objectif de permettre l'obtention de solutions de complexes stables et concentrées en ADN ainsi que de réduire la taille des complexes formés en comparaison à une formulation classique.

Afin de vérifier l'apport de la formulation par extrusion, des formulations ont été réalisées avec une *l*PEI(his) de 15,9 kDa dans les mêmes conditions (même plasmide, même polymère, même WR) par voie classique ou par extrusion. Deux concentrations en ADN_p ont été utilisées : une concentration faible utilisée pour les tests *in vitro* et une concentration élevée utilisée pour les tests *in vivo*. Les caractéristiques et résultats sont présentés dans le **Tableau IV.5**.

Tableau IV.5 : Comparaison de formulations par extrusion ou par voie classique à deux concentrations en ADN différentes avec une *l*PEI(his) comportant un bloc PEI de 15,9 kDa et fonctionnalisée à 11,4 % par l'histidine.

Run	DNA solution		Polymer solution				Extrusions parameters			Polymer/DNA			DLS analysis		
	[DNA] ¹ μg.mL ⁻¹	V mL	PEI	%PEI ²	[polymer] mg.mL ⁻¹	V mL	Ø nm	P bar	[DNA _{trans}] _{th} mg.mL ⁻¹	WR ³ polymer	WR ⁴ PEI	N/P ⁵	D _{H n} ⁶ (nm)	D _{H i} ⁷ (nm)	PDI
GwD-F-22	71.4	0.84	PLL 131	62	0.5	0.36	30	2	0.05	3	1.9	14	72	162	0.19
GwD-F-27		0.56					-	-					154	217	0.11
GwD-F-38	714	0.56	PLL 131	62	5	0.24	100	1	0.5	3	1.9	14	164	266	0.20
GwD-F-28							-	-					Precipitation		

Solvent for DNA and polymer solution: Hepes 10 mM

¹ DNA used = pTG11033

² %PEI = $M_{n\text{ PEI th}} / M_{n\text{ polymer}}$

³ $WR_{\text{polymer}} = \text{mass of polymer} / \text{mass of DNA}$

⁴ $WR_{\text{PEI}} = \text{mass of polymer} \times \%PEI / \text{mass of DNA}$

⁵ N/P = moles of EI_{total} / moles of phosphate

⁶ D_{H n} = D_H obtained by DLS in number

⁷ D_{H i} = D_H obtained by DLS in intensity

A basse concentration, la formulation réalisée par extrusion permet l'obtention de polyplexes avec un diamètre hydrodynamique moyen en nombre de 72 nm. Par rapport à la formulation classique réalisée dans les mêmes conditions, une diminution de 82 nm est obtenue grâce à l'extrusion. A haute concentration, la formulation classique ne permet pas l'obtention de solutions stables comme vu précédemment. La technique de l'extrusion permet l'obtention d'une solution homogène sans agrégats avec des complexes d'un diamètre hydrodynamique en nombre de 164 nm.

La formulation par extrusion permet ainsi un réel apport bénéfique en comparaison à la formulation classique. D'une part, une diminution de la taille des complexes est observée à basse concentration. Et d'autre part, pour la première fois, des solutions stables sont obtenues sans sédimentation d'agrégats à une concentration en ADN élevée de 0,5 mg.mL⁻¹ permettant d'envisager des études *in vivo* concurrentielles aux thérapies virales.

La suite de cette partie s'intéresse à l'influence des divers paramètres modulables (mécaniques ou chimiques) lors de la formulation des polyplexes par extrusion dans le but d'obtenir des complexes inférieurs à 100 nm.

II.3. Paramétrage de l'extrusion

Dans le but d'optimiser les conditions de formulation par extrusion pour obtenir des polyplexes les plus petits possibles, l'étude des paramètres variables de l'extrudeuse a, tout d'abord, été réalisée. Le diamètre des pores peut être modulé suivant la membrane choisie et la pression peut être modifiée à l'aide du manomètre. Les tests sont réalisés ici avec une polyéthylèneimine linéaire de 10 kDa (GwD-137).

II.3.a. Diamètre des pores de la membrane

Trois membranes possédant des tailles de pores calibrés de 30, 50 et 100 nm sont disponibles au laboratoire. Les membranes contiennent toutes un nombre de pores par unité de surface constant de 6.10^{12} pores/m². Des formulations sont réalisées en utilisant le pTG11033, une lPEI de 10 kDa et les différentes membranes. Les caractéristiques des extrusions et les résultats sont présentés dans le **Tableau IV.6**.

Tableau IV.6 : Paramètres et résultats des extrusions en fonction du diamètre de pore de la membrane avec une lPEI de 10 kDa.

Run	DNA solution		Polymer solution			Extrusions parameters			Polymer/DNA			DLS analysis			
	[DNA] ¹ µg.mL ⁻¹	V mL	PEI	%PEI ²	[polymer] mg.mL ⁻¹	V mL	Ø nm	P bar	[DNA] _{trans} ³ mg.mL ⁻¹	WR ³ polymer	WR ⁴ PEI	N/P ⁵	D _{H n} ⁶ (nm)	D _{H i} ⁷ (nm)	PDI
GwD-F-69			GwD-137				30						93	167	0.20
GwD-F-70	71.4	0.56		100	0.5	0.24	50	2	0.05	3	3	23	92	164	0.19
GwD-F-71							100							85	173

Solvent for DNA and polymer solution: Hepes 10 mM

¹ DNA used = pTG11033

² %PEI = $M_{n \text{ PEI th}} / M_{n \text{ polymer}}$

³ WR_{polymer} = mass of polymer / mass of DNA

⁴ WR_{PEI} = mass of polymer × %PEI / mass of DNA

⁵ N/P = moles of EI_{total} / moles of phosphate

⁶ D_{H n} = D_H obtained by DLS in number

⁷ D_{H i} = D_H obtained by DLS in intensity

Le graphique présent en **Figure IV.3** représente l'évolution des diamètres hydrodynamiques des polyplexes obtenus en fonction du diamètre des pores de la membrane utilisée.

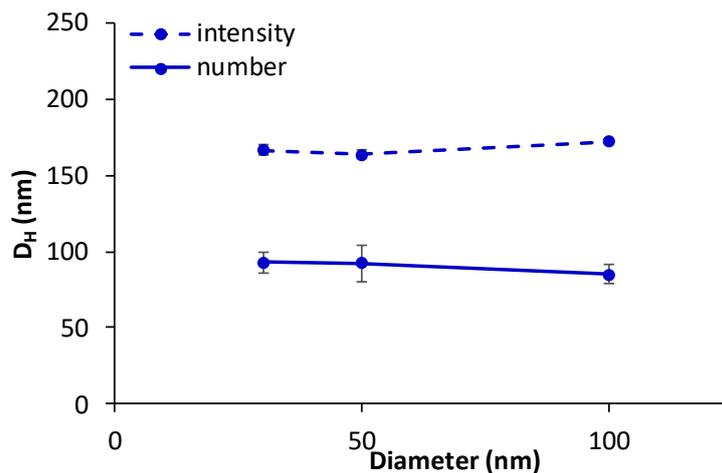


Figure IV.3 : Diamètres hydrodynamiques des polyplexes en intensité et en nombre obtenus par DLS en fonction du diamètre des pores de la membrane ($M_n_{PEI} = 10$ kDa, Solvent : Hepes 10 mM). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.

Les analyses DLS montrent que les polyplexes présentent des diamètres hydrodynamiques très proches, compris entre 85 et 93 nm. La faible différence suggère que le diamètre des pores de la membrane n'est pas un paramètre déterminant dans la formulation des polyplexes.

Pour la suite des analyses, la membrane de 30 nm sera conservée afin de favoriser une structure étirée de l'ADN p en sortie de pores lors de l'extrusion permettant la complexation de la molécule d'ADN avec le polymère dans une forme plus condensée.

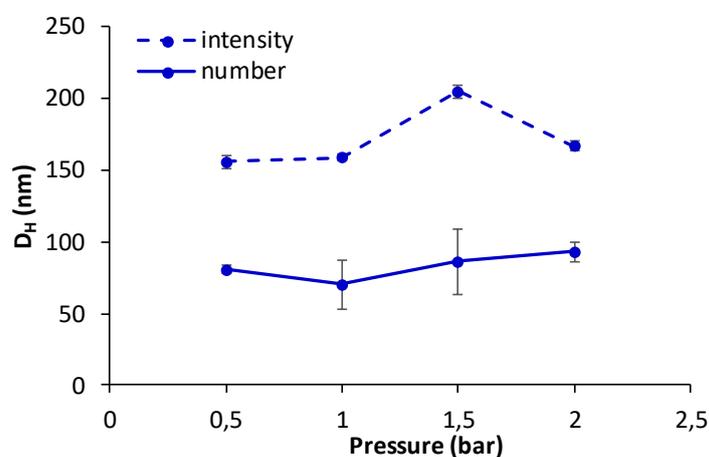
II.3.b. Pression de l'extrusion

La pression de consigne régulant la force appliquée sur le piston *Cis* lors de l'extrusion est le deuxième paramètre modulable sur l'appareil. Le manomètre peut être réglé entre 0,5 et 10 bars, néanmoins pour notre étude, nous nous sommes limités à une gamme s'étalant de 0,5 à 2 bars. (**Tableau IV.7**). La **Figure IV.4** représente l'évolution des diamètres hydrodynamiques des polyplexes, mesurés par DLS, en fonction de la pression appliquée.

Tableau IV.7 : Paramètres et résultats des extrusions en fonction de la pression d'extrusion avec une PEI de 10 kDa.

Run	DNA solution		Polymer solution			Extrusions parameters			Polymer/DNA			DLS analysis		
	[DNA] ¹ μg.mL ⁻¹	V mL	PEI	%PEI ² [polymer] mg.mL ⁻¹	V mL	Ø nm	P bar	[DNA _{trans}] _{th} mg.mL ⁻¹	WR ³ polymer	WR ⁴ PEI	N/P ⁵	D _{H n} ⁶ (nm)	D _{H i} ⁷ (nm)	PDI
GwD-F-72	71.4	0.56	GwD-137	100	0.5	30	0.5	0.05	3	3	23	81	156	0.21
GwD-F-73							1.0					70	159	0.20
GwD-F-74							1.5					86	205	0.24
GwD-F-69							2.0					93	167	0.20

Solvent for DNA and polymer solution: Hepes 10 mM

¹ DNA used = pTG11033² %PEI = $M_{n\ PEI\ th} / M_{n\ polymer}$ ³ $WR_{polymer}$ = mass of polymer / mass of DNA⁴ WR_{PEI} = mass of polymer × %PEI / mass of DNA⁵ N/P = moles of EI_{total} / moles of phosphate⁶ D_{H n} = D_H obtained by DLS in number⁷ D_{H i} = D_H obtained by DLS in intensity**Figure IV.4** : Diamètres hydrodynamiques des polyplexes en intensité et en nombre obtenus par DLS en fonction de la pression d'extrusion ($M_{n\ polymère} = 10\ kDa$, Solvant : Hepes 10 mM). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.

Les diamètres hydrodynamiques des polyplexes montrent une dépendance en fonction de la pression appliquée. A 0,5 bar, des polyplexes d'environ 80 nm en nombre sont obtenus. Lorsque la pression augmente à 1 bar, une diminution est observée permettant l'obtention de complexes de 70 nm. Puis le diamètre augmente lorsque la pression passe à 1,5 et 2 bars. L'hypothèse faite ici est, qu'à faible pression, le flux de la solution du compartiment *Cis* dans le compartiment *Trans* ne serait pas assez important afin de permettre un mélange correct dans le compartiment *Trans*. L'augmentation de la pression à 1 bar permet ce mélange et ainsi l'obtention de polyplexes plus petits. Cependant, si l'augmentation est trop importante, le flux trop rapide engendrerait la complexation d'un nombre plus important de plasmides par polyplexe et ainsi l'augmentation de la taille des complexes.

En se basant sur ces résultats, les extrusions suivantes ont donc été réalisées à une pression de 1 bar.

II.4. Influence du vecteur

Pour rappel, la formation d'un complexe par l'appariement de polyélectrolytes de charges opposés se réalise en plusieurs étapes.¹⁵ L'hypothèse est faite que ces étapes mises en évidence lors des études de Kulkarni se reproduisent lors de l'extrusion. Ainsi, lors de l'extrusion, la molécule d'ADN p étirée en sortie de pore sera complexée par des chaînes macromoléculaires très rapidement créant des structures hors équilibre. Puis, un réarrangement des polyplexes, phénomène avec une cinétique lente, permet la formation de complexes à l'équilibre.¹⁵ Dans le but de permettre l'obtention de complexes les plus petits possibles à l'équilibre, il est nécessaire d'évaluer l'influence des paramètres des polyélectrolytes. Le plasmide étant prédéfini par les besoins biologiques, l'influence du polymère dans la formation des complexes est étudié.

Les paramètres des vecteurs polymères pouvant être modulés étant très larges, une sélection a été effectuée. Ainsi, l'influence de la masse molaire, de la fonctionnalisation, de l'architecture du polymère, ainsi que celle du rapport massique polymère/ADN p (WR) et du taux de protonation du polymère seront étudiés dans ce manuscrit. L'objectif est d'identifier les paramètres qui permettront de formuler des polyplexes avec un D_H inférieur à 100 nm. Les extrusions seront réalisées avec les paramètres mis au point précédemment à savoir des pores d'un diamètre de 30 nm et une pression de 1 bar.

Les tests ont été principalement réalisés avec une *l*PEI de 10 ou 15 kDa. Des formulations à base de *l*PEI-*b*-PiPrOx ou de *l*PEI(his) ont également été utilisées dans cette étude afin d'étudier l'impact de la fonctionnalisation. De plus, certaines extrusions réalisées préalablement à l'optimisation des paramètres d'extrusion sont également présentées ici. La production de plasmide étant coûteuse, il n'a pas toujours été possible de recommencer l'étude dans les conditions optimisées avec une *l*PEI modèle.

II.4.a. Masse molaire du polymère

Le nombre de charges positives par macromolécule étant reliée à la masse molaire de la chaîne PEI est un paramètre pouvant influencer la complexation de l'ADN p et donc la taille des nanoparticules formées. Schubert et son équipe montrent, notamment, une augmentation du

diamètre hydrodynamique de 120 à 270 nm des complexes formés à partir de /PEI de 0,8 à 25 kDa à un N/P 2,5 par mélange simple des deux polyélectrolytes.¹⁶

Ainsi, dans le but d'évaluer l'influence de la masse molaire des polymères sur la formulation des polyplexes, différentes extrusions ont été réalisées avec la bibliothèque de /PEI à notre disposition. Quatre masses molaires ont été testées, 5, 10, 15 et 25 kg.mol⁻¹, couvrant la gamme de masse molaire habituellement utilisée pour les /PEI comme présenté dans le chapitre 1.^{16,17} De plus, les mêmes polymères fonctionnalisés par l'histidine (entre 8,1 et 12,8 %) ont également été étudiés (**Tableau IV.8**). La **Figure IV.5** présente l'évolution des diamètres hydrodynamiques des polyplexes en fonction de la masse molaire de la /PEI.

Tableau IV.8 : Paramètres et résultats des extrusions réalisées avec une membrane de 30 nm et une pression de 1 bar en fonction de la masse molaire de la PEI.

Run	DNA solution		Polymer solution				Polymer/DNA			DLS analysis				
	[DNA] ¹ µg.mL ⁻¹	V mL	PEI	M _n PEI kg.mol ⁻¹	%PEI ² [polymer] mg.mL ⁻¹	V mL	WR ³ polymer	WR ⁴ PEI	N/P ⁵	D _{H n} ⁶ (nm)	D _{H i} ⁷ (nm)	PDI		
GwD-F-76	71.4	0.56	GwD-138	5	100	0.5	0.24	3	3	23	83	151	0.19	
GwD-F-73			GwD-137	10							70	159	0.2	
GwD-F-75			GwD-132	15							78	180	0.2	
GwD-F-77			PLL-119	25							91	182	0.21	
GwD-F-80	71.4	0.56	GwD-156	5	69	0.72	0.24	4.3	3	23	93	161	0.18	
GwD-F-78			GwD-154	10	59	0.84					5.1	80	185	0.23
GwD-F-101			GwD-172	15	61	0.82					4.9	108	175	0.16
GwD-F-79			ASV4	25	66	0.76					4.5	129	198	0.14

Extrusion parameters: diameter = 30 nm, pressure = 1 bar

Solvent for DNA & polymer solution: Hepes 10mM

[DNA]_{th} = 0.05 mg.mL⁻¹

¹ DNA used = pTG11033

² %PEI = M_{n PEI th} / M_{n polymer}

³ WR_{polymer} = mass of polymer / mass of DNA

⁴ WR_{PEI} = mass of polymer × %PEI / mass of DNA

⁵ N/P = moles of EI_{total} / moles of phosphate base

⁶ D_{H n} = D_H obtained by DLS in number

⁷ D_{H i} = D_H obtained by DLS in intensity

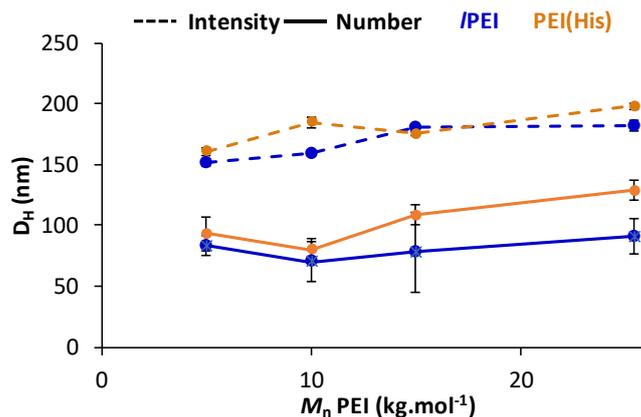


Figure IV.5 : Diamètres hydrodynamiques des polyplexes en intensité et en nombre obtenus par DLS en fonction de la masse molaire de la PEI (Solvant : Hepes 10 mM). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.

Concernant les /PEI non fonctionnalisées par l'histidine (données en bleu), le D_H en nombre le plus faible est obtenu pour des polyplexes réalisés avec la /PEI 10 kDa ($D_H = 70$ nm). L'utilisation de polymères de masses molaires 5 kDa et 15 kDa conduit à des polyplexes de l'ordre de 80 nm, soit avec un D_H en nombre plus élevé d'environ 10 nm. Enfin, à plus haute masse molaire, 25 kDa, les polyplexes sont, en moyenne, 20 nm plus grands qu'avec la /PEI de 10 kDa. Ainsi, il semble important de formuler les polyplexes avec des /PEI ayant une masse molaire de l'ordre de 10 kDa afin de favoriser la formulation de complexes les plus petits possibles.

La même étude a été conduite avec des /PEI histidinylées. Le greffage des résidus histidine sur la chaîne polymère engendre une augmentation de la taille des polyplexes d'environ 10 nm à faible masse molaire et d'environ 40 nm pour la /PEI de 25 kDa en comparaison aux /PEI non fonctionnalisées. Ce résultat est en accord avec la modification chimique réalisée. En effet, le greffage des résidus histidine apporte une hétérogénéité à la structure régulière des chaînes /PEI et ralenti alors la dynamique du polyélectrolyte positif au moment de la complexation, conduisant ainsi à une agrégation plus importante des polyplexes lors de la phase initiale de formation des complexes. De plus, la structure moins régulière de ces polymères peut entraîner une organisation interne différente des complexes de celle des complexes formés à partir de /PEI. Néanmoins, la même tendance est observée : les complexes les plus petits sont obtenus avec une /PEI(his) contenant un bloc PEI de 10 kDa (80 nm en nombre).

II.4.b. Architecture des polymères

Diverses structures de polymères ont été synthétisées au laboratoire avec pour objectif d'améliorer diverses étapes de la transfection selon la fonctionnalisation réalisée. La fonctionnalisation de la *l*PEI a, cependant, une influence sur la complexation de l'ADN ρ .

En ce qui concerne les PEI en étoile, leur structure plus compacte peut influencer sur la complexation de l'ADN ρ et former des complexes plus denses (**Figure IV.6.b**).

D'autre part, les copolymères PEI-*b*-PiPrOx présentent une partie hydrophile pouvant se placer à l'extérieur des complexes afin de former une couronne hydrophile (**Figure IV.6.c**). Cette couronne hydrophile et neutre doit alors empêcher la complexation de nouvelles chaînes polymère lors de la formulation permettant l'obtention de complexes plus petits. Les résultats de Zhang *et al.*¹⁸ montrent, en effet, une diminution de la taille des complexes formulés avec un copolymère PEI_{25kDa}-PEG_{5kDa} en comparaison à une PEI_{25kDa}.

Dans le cas d'une fonctionnalisation des copolymères par le galactose, la couronne hydrophile pourra alors présenter des résidus galactose en surface des complexes (**Figure IV.6.d**).

Enfin, la fonctionnalisation par l'histidine modifiant la structure très linéaire de la *l*PEI modifie la complexation de l'ADN ρ (**Figure IV.6.e**). Une précédente étude de l'équipe a, en effet, mis en évidence ce changement d'organisation.¹⁹ Ainsi, les caractéristiques des polyplexes formulés par extrusion avec ces divers polymères doit être étudiées.

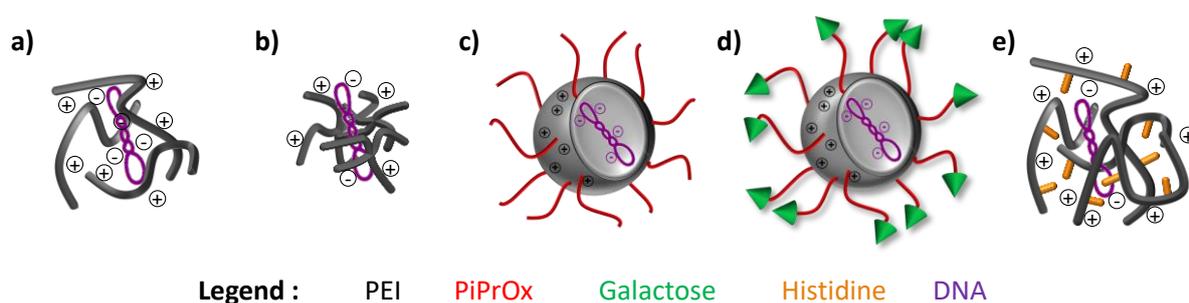


Figure IV.6 : Structures supposées des complexes formés à partir des divers polymères fonctionnels : (a) avec une PEI linéaire, (b) avec une PEI en étoile à 4 branches, (c) avec un copolymère PEI-*b*-PiPrOx, (d) avec un copolymère PEI-*b*-PiPrOx fonctionnalisé par du galactose et (e) avec un polymère *l*PEI histidinylé.

Les bibliothèques de *l*PEI, de PEI-*b*-PiPrOx et de PEI en étoile et de leurs homologues fonctionnalisés par l'histidine ou le galactose disponibles au laboratoire ont été utilisées. Les résultats précédents montrant un avantage pour un bloc PEI dans une gamme de 10 à 15 kDa,

les polymères dans cette étude présentent tous un bloc PEI de 15 kDa car les fonctionnalisations ont été réalisées de façon concluante uniquement sur ces polymères. Cette masse molaire de 15 kDa en PEI reste tout de même en accord avec les résultats de la littérature mentionnant de bons résultats en transfert de gènes avec des PEI comprises entre 3 et 25 kDa.^{16,17}

Les caractéristiques des polyplexes formulés par extrusion sont présentés dans le **Tableau IV.9**. La **Figure IV.7** représente la taille des polyplexes obtenus en fonction de la structure et de la fonctionnalisation du polymère.

Tableau IV.9 : Paramètres et résultats des extrusions en fonction de l'architecture du polymère.

Run	DNA solution		Polymer solution				Polymer/DNA			DLS analysis						
	[DNA] ¹ µg.mL ⁻¹	V mL	PEI	M _n PEI kg.mol ⁻¹	%PEI ² [polymer] mg.mL ⁻¹	V mL	WR ³ polymer	WR ⁴ PEI	N/P ⁵	D _{Hn} ⁶ (nm)	D _{Hi} ⁷ (nm)	PDI				
GwD-F-75	71.4	0.56	GwD-132	15	100	0.50	3	3	23	78	180	0.20				
GwD-F-101			GwD-172		61	0.82							4.9	108	175	0.16
GwD-F-86	71.4	0.56	GwD-151	15	73	0.69	4.1	3	23	94	171	0.19				
GwD-F-90			GwD-148		69	0.72							4.4	187	250	0.13
GwD-F-88			GwD-146		42	1.19							7.2	121	244	0.25
GwD-F-87	71.4	0.56	PLL113	16.1	100	0.50	3	3	23	93	157	0.15				
GwD-F-89			PLL125		54	0.92							5.6	139	197	0.11

Extrusion parameters: diameter = 30 nm, pressure = 1 bar

Solvent for DNA & polymer solution: Hepes 10mM

[DNA]_{th} = 0.05 mg.mL⁻¹

¹ DNA used = pTG11033

² %PEI = M_{n PEI th} / M_{n polymer}

³ WR_{polymer} = mass of polymer / mass of DNA

⁴ WR_{PEI} = mass of polymer × %PEI / mass of DNA

⁵ N/P = moles of EI_{total} / moles of phosphate base

⁶ D_{Hn} = D_H obtained by DLS in number

⁷ D_{Hi} = D_H obtained by DLS in intensity

GwD-132 : linear PEI, GwD-172 : histidinylated linear PEI, PLL113 : star PEI, PLL125 : histidinylated star PEI

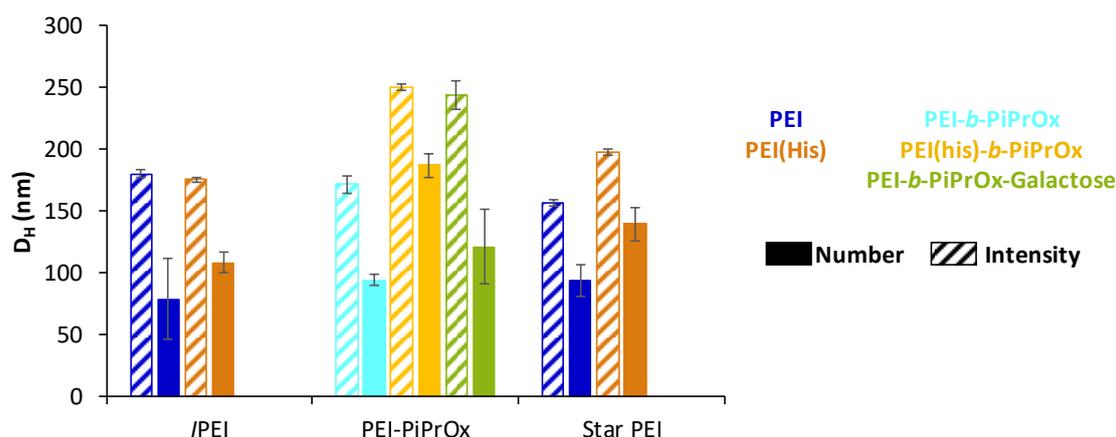


Figure IV.7 : Diamètres hydrodynamiques des polyplexes en intensité et en nombre mesurés par DLS en fonction de l'architecture du polymère (M_n PEI \approx 15 kDa, Solvant : Hepes 10 mM). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.

Tout d'abord, des polymères PEI non fonctionnalisés de structure linéaire, en étoile à 4 branches ou portant un bloc hydrophile POx ont été utilisés (données en bleu foncé ou clair).

Ces différents polymères contenant un bloc PEI de même masse molaire (15 kDa) permettent l'obtention de nanoparticules dont le diamètre est compris entre 78 et 94 nm. Les polyplexes les plus petits sont obtenus en utilisant de la *l*PEI.

Probablement la structure plus homogène des chaînes *l*PEI favorise la complexation entre les 2 entités et donc la condensation de l'ADN_p. L'augmentation du diamètre hydrodynamique de 16 nm lors de l'utilisation du copolymère PEI-*b*-PiPrOx est, cependant, contraire à la théorie. Différentes hypothèses sont avancées : l'ajout du bloc hydrophile peut engendrer une structure interne différente des complexes menant à des complexes de taille plus élevée. De plus, ce bloc PiPrOx légèrement hydrophobe peut s'autoorganiser menant à une organisation différente des complexes. Une autre hypothèse est la masse molaire du bloc hydrophile qui peut ne pas être suffisante pour permettre l'obtention d'une couronne protectrice comme l'ont observé Zhang *et al.*¹⁸ dans le cas d'un bloc PEG de 2 kDa. Enfin, d'un point de vue cinétique, l'augmentation de la masse molaire totale du polymère peut entraîner une diminution de la dynamique des polycations menant à des complexes de tailles plus élevées lors de la complexation.

Pour la structure en étoile menant à une augmentation du diamètre hydrodynamique de 15 nm en nombre, l'hypothèse d'une structure interne différente est également faite.

Quelle que soit la structure étudiée, la présence d'histidine induit une augmentation de la taille des polyplexes. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment obtenus avec des *l*PEI(his) de différentes masses molaires et la précédente étude de l'équipe.¹⁹

La fonctionnalisation du copolymère PEI-*b*-PiPrOx par le galactose montre également une augmentation de la taille des polyplexes de 27 nm en comparaison au PEI-*b*-PiPrOx non fonctionnalisé. Cette augmentation de taille n'était pas attendue. En effet, l'ajout d'un ligand de ciblage en surface des complexes peut augmenter la taille de ceux-ci de quelques nanomètres, cependant l'augmentation de 27 nm observée ici ne peut pas être uniquement expliquée par ce phénomène. L'enchaînement carboné hydrophobe formé lors de la fonctionnalisation engendrant une structure différente des complexes pourrait être une explication à cette augmentation.

II.4.c. Rapport massique polymère/ADN_p

Les formulations sont généralement réalisées à un rapport massique 3/1 ou 6/1 polymère/ADN_p. Lorsque le polymère est une PEI (linéaire ou branchée), cela correspond à

des rapports N/P (nombre d'atomes d'azote des motifs EI / nombre de groupes phosphate de l'ADN p) de 23 ou de 46 respectivement. Le rapport charges (+) / charges (-) est corrélé au rapport massique polymère/ADN p (weight ratio, WR). En effet, à un pH donné, la protonation des polyélectrolytes étant fixe, si une quantité de polymère plus importante est ajoutée alors le rapport charges (+) / charges (-) augmentera également. La formulation des complexes est influencée par ce rapport comme le montre notamment la publication de Zhang *et al.* L'utilisation de rapports N/P croissants permet une diminution des tailles des complexes.

Dans cette étude, l'influence du WR sur la formulation des polyplexes dans le cas d'une lPEI et d'une lPEI(his) est étudiée. Dans le tableau, deux WR sont mentionnés. Le premier, noté WR_{polymer} , prend en compte la masse totale de polymère. Le deuxième, noté WR_{PEI} , est calculé en ne considérant que la masse du squelette macromoléculaire PEI, c'est-à-dire que le poids apporté par les résidus histidine n'est pas pris en compte. Par exemple, une lPEI de 10 kDa modifiée à 10 % par des résidus histidine a une masse molaire totale de 15.4 kDa. Le pourcentage en poids du squelette macromoléculaire est alors de 65%. Il faut donc prendre en compte la variation importante de la masse molaire du polymère après fonctionnalisation lors de la formulation, puisque le rapport N/P est fortement impacté si uniquement le WR_{polymer} est utilisé.

L'étude a ainsi été effectuée à un WR_{polymer} 3/1 et 6/1 mais également à un WR_{PEI} de 3/1 et 6/1 (**Tableau IV.10**). La **Figure IV.8** représente la taille des complexes formulés aux différents WR_{polymer} et WR_{PEI} .

Tableau IV.10 : Paramètres et résultats des extrusions en fonction du ratio massique polymère/ADN*p* avec une *l*PEI et une *l*PEI(his) comportant un bloc PEI de 10 kDa.

Run	DNA solution		Polymer solution				Polymer/DNA			DLS analysis			
	[DNA] ¹ μg.mL ⁻¹	V mL	PEI	M _n PEI kg.mol ⁻¹	%PEI ² [polymer] mg.ml ⁻¹	V mL	WR ³ polymer	WR ⁴ PEI	N/P ⁵	D _{Hn} ⁶ (nm)	D _{Hi} ⁷ (nm)	PDI	
GwD-F-85			GwD-137		0.3		1.7	1.7	13.4	90	162	0.19	
GwD-F-73	71.4	0.56		10	100	0.5	0.24	3.0	3.0	23	70	159	0.20
GwD-F-81						1.0		6.0	6.0	46.1	71	168	0.22
GwD-F-83			GwD-154		0.5		3.0	1.7	13.6	96	156	0.13	
GwD-F-78	71.4	0.56		10	59	0.85	0.24	5.1	3.0	23.2	80	185	0.23
GwD-F-84						1.0		6.0	3.5	27.3	101	162	0.13
GwD-F-82						1.7		10.2	6.0	46.3	97	156	0.14

Extrusion parameters: diameter = 30 nm, pressure = 1 bar

Solvent for DNA & polymer solution: Hepes 10mM

[DNA]_{th} = 0.05 mg.mL⁻¹

¹ DNA used = pTG11033

² %PEI = M_n PEI_{th} / M_n polymer

³ WR_{polymer} = mass of polymer / mass of DNA

⁴ WR_{PEI} = mass of polymer × %PEI / mass of DNA

⁵ N/P = moles of EI_{total} / moles of phosphate base

⁶ D_{Hn} = D_H obtained by DLS in number

⁷ D_{Hi} = D_H obtained by DLS in intensity

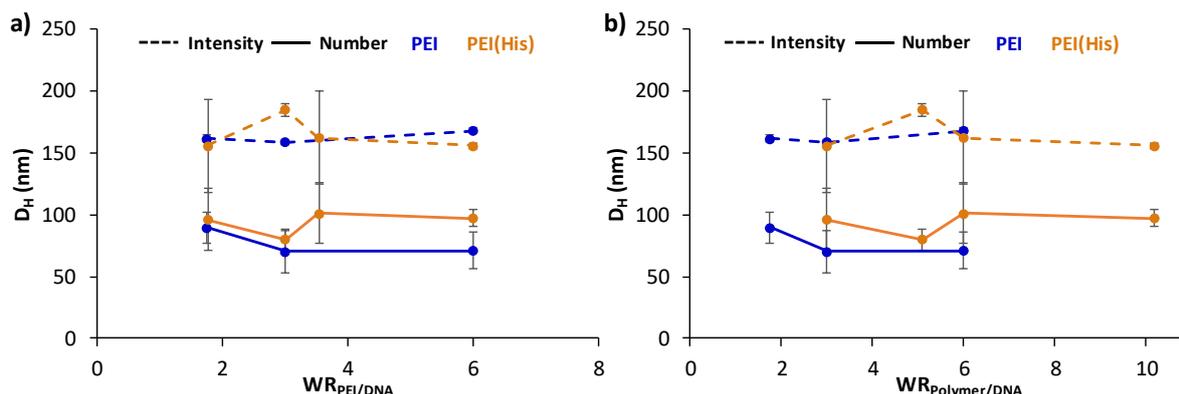


Figure IV.8 : Diamètres hydrodynamiques des polyplexes en intensité et en nombre mesurés par DLS en fonction (a) du ratio massique PEI/ADN*p* et (b) du ratio massique polymère/ADN*p* (M_n PEI = 10 kDa, Solvant : Hepes 10 mM). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.

Tout d’abord, pour les deux polymères *l*PEI ou *l*PEI(his), les polyplexes les plus petits sont obtenus pour un WR_{PEI} de 3. En effet, à plus bas WR_{PEI}, l’excès de charge positive n’étant pas assez important, des polyplexes de D_H plus élevés sont obtenus. Cela est tout à fait en accord avec le diagramme de phase présenté dans le chapitre 1. Lorsque qu’un WR_{PEI} trop proche de l’électroneutralité est utilisé, ici 1,7, des agrégats peuvent être formés dû à la faible répulsion des polyplexes entre eux. Un WR_{PEI} supérieur permet une stabilisation des polyplexes formés par l’excès de charges positives en surface. A des WR_{PEI} supérieurs à 3, aucune influence n’est observée pour la *l*PEI. En revanche, une augmentation du D_H est observée pour la *l*PEI(his)

pouvant être expliquée par la perte d'organisation interne des polyplexes en présence de résidus histidine comme mentionné précédemment.

Ainsi, il est nécessaire de conserver un WR_{PEI} minimal, mais suffisant, dans le but d'obtenir des polyplexes avec un D_H faible. Après fonctionnalisation des chaînes PEI, il est important d'évaluer la variation de la masse molaire du polymère et de calculer WR par rapport au pourcentage massique de PEI contenu dans le polymère.

II.4.d. pH

La complexation du vecteur polymère avec l'ADN p est dépendante du rapport N/P comme le montre l'étude précédente. Il est, en effet, nécessaire d'avoir un excès de charges positives par rapport aux charges négatives portées par l'ADN p afin de permettre une bonne complexation et condensation des macromolécules d'ADN p . Cependant, la protonation des amines des motifs éthylènimine a été montrée comme dépendante du pH. A pH 7,4, 15 % des amines sont protonées et à pH 5, ce taux de protonation augmente à 45 %.¹¹ Les chaînes PEI portent donc plus de charges positives à pH acide. Ainsi, cette propriété peut être mise à profit afin d'accélérer la cinétique de complexation de l'ADN p en sortie de pore en utilisant un même WR_{PEI} .

Dans le cadre de cette étude, des formulations sont réalisées avec une PEI-*b*-PiPrOx de 20,6 kDa (PEI = 15 kDa) ainsi qu'une *l*PEI(his) de 25,7 kDa (PEI = 15.9 kDa). Les solutions de polymère sont à pH 7 ou à pH 4,5 afin d'évaluer l'influence du taux de protonation des chaînes polymère sur la formation des complexes ADN p /Polymère. Après extrusion, la formulation est laissée au repos pendant trente minutes, puis le pH est ajusté à 7 si nécessaire avant l'analyse DLS (cet ajustement n'est pas toujours nécessaire car l'ajout de la solution d'ADN p tamponnée par l'hepes 10 mM lors de l'extrusion permet, dans certains cas, le réajustement du pH).

Tableau IV.11 : Paramètres et résultats des extrusions en fonction du pH de la solution de polymère.

Run	DNA solution		Polymer solution					Polymer/DNA			DLS analysis			
	[DNA] ¹ μg.mL ⁻¹	V mL	PEI M _{n,PEI} kg.mol ⁻¹	%PEI ²	[polymer] mg.ml ⁻¹	V mL	pH	WR ³ polymer	WR ⁴ PEI	N/P ⁵	D _{H n} ⁶ (nm)	D _{H i} ⁷ (nm)	PDI	
GwD-F-44	71.4	0.56	SAK-4	15	72	0.5	0.24	7	3.0	2.2	17	208	0.17	139
GwD-F-45												179	0.23	76
GwD-F-13	71.4	0.56	PLL131	15.9	63	0.5	0.24	7	3.0	1.9	14	180	0.15	117
GwD-F-22												162	0.19	72

Extrusion parameters: diameter = 30 nm, pressure = 1 bar

Solvent for DNA & polymer solution: Hepes 10mM

[DNA]_{th} = 0.05 mg.mL⁻¹

¹ DNA used = pTG11033

² %PEI = M_{n,PEI th} / M_{n polymer}

³ WR_{polymer} = mass of polymer / mass of DNA

⁴ WR_{PEI} = mass of polymer × %PEI / mass of DNA

⁵ N/P = moles of EI_{total} / moles of phosphate base

⁶ D_{H n} = D_H obtained by DLS in number

⁷ D_{H i} = D_H obtained by DLS in intensity

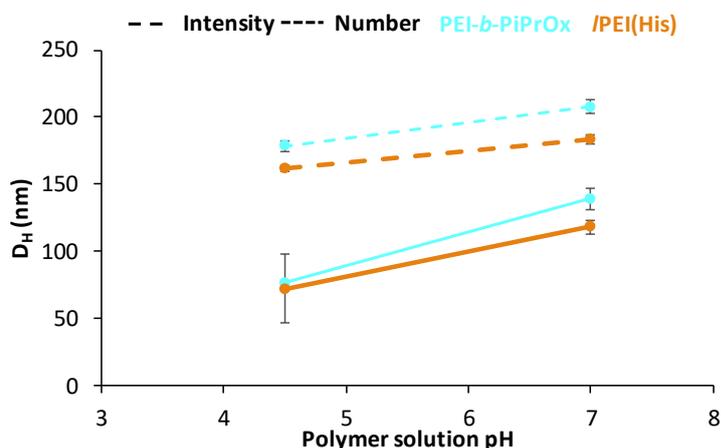


Figure IV.9 : Diamètres hydrodynamiques des polyplexes en intensité et en nombre obtenus par DLS en fonction du pH de la solution de polymère ($M_{n,PEI} \approx 15$ kDa, Solvant : Hepes 10 mM, analyses à pH 7). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.

Quel que soit le polymère testé (PEI-*b*-PiPrOx ou lPEI(his)), une augmentation du diamètre hydrodynamique des complexes est observée avec le pH. Ainsi, la densité de charge de la chaîne PEI influence la complexation de l'ADN_p : à plus haute densité de charge (pH acide), les polyplexes obtenus sont plus petits. De plus, la plus grande quantité de charges positives peut limiter ensuite l'agrégation des complexes entre eux. Une amélioration de la cinétique de complexation semble donc avoir lieu à pH acide.

II.5. Cryo-TEM

Les complexes ont été analysés par cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-TEM) dans le but d'observer la structure des polyplexes et de compléter les informations obtenues lors des analyses de tailles réalisées par DLS.

Deux formulations réalisées par extrusion (GwD-F-49 et GwD-F-45) avec des copolymères PEI-*b*-PiPrOx à deux concentrations en ADN_p (0,05 mg/L, concentration utilisée pour les analyses *in vitro*, et 0,5 mg.mL⁻¹, concentration utilisée pour les analyses *in vivo*) ont été analysées. Parallèlement, deux formulations classiques ont été réalisées dans les conditions habituelles d'une observation par microscopie soit 0,2 mg.mL⁻¹ en ADN_p avec un copolymère PEI-*b*-PiPrOx (GwD-82) et une /PEI (PLL118). Le **Tableau IV.12** résume les caractéristiques des différentes formulations et la **Figure IV.10** présente les structures obtenues pour les différentes formulations.

Tableau IV.12 : Paramètres des formulations classiques et par extrusion pour analyses Cryo-TEM.

Run	DNA solution		Polymer solution					[DNA] _{th} (mg.mL ⁻¹)	Polymer/ DNA			DLS analysis			Cryo-TEM	
	[DNA] ¹ (μg.mL ⁻¹)	V (mL)	PEI	M _n PEI (kg.mol ⁻¹)	%PEI ²	[polymer] (mg.mL ⁻¹)	V (mL)		pH	WR ³ _{polymer}	WR _{PEI} ⁴	N/P ⁵	D _{Hn} ⁶ (nm)	D _{H1} ⁷ (nm)	PDI	Size (nm)
Classic	-	-	PLL118	25	100	-	-	7	0.2	3.0	3.0	23	-	-	-	49 ± 8 & (97 ± 21) × (23 ± 3)
			GwD-82	10	64	-	-	-		3.0	1.9	14	-	-	-	153 ± 71
GwD-F-49	714	0.56	SAK-4	15	72	5	0.24	4.5	0.5	3.0	2.2	17	207	389	0.34	103 ± 25
GwD-F-45	71.4			0.5	4.5	0.05	76	179	0.23	77 ± 15						

Extrusion parameters: diameter = 30 nm, pressure = 1 bar

Solvent for DNA & polymer solution: Hepes 10mM

¹ DNA used = pTG11033

² %PEI = M_n PEI th / M_n polymer

³ WR_{polymer} = mass of polymer / mass of DNA

⁴ WR_{PEI} = mass of polymer × %PEI / mass of DNA

⁵ N/P = moles of EI_{total} / moles of phosphate base

⁶ D_{Hn} = D_H obtained by DLS in number

⁷ D_{Hi} = D_H obtained by DLS in intensity

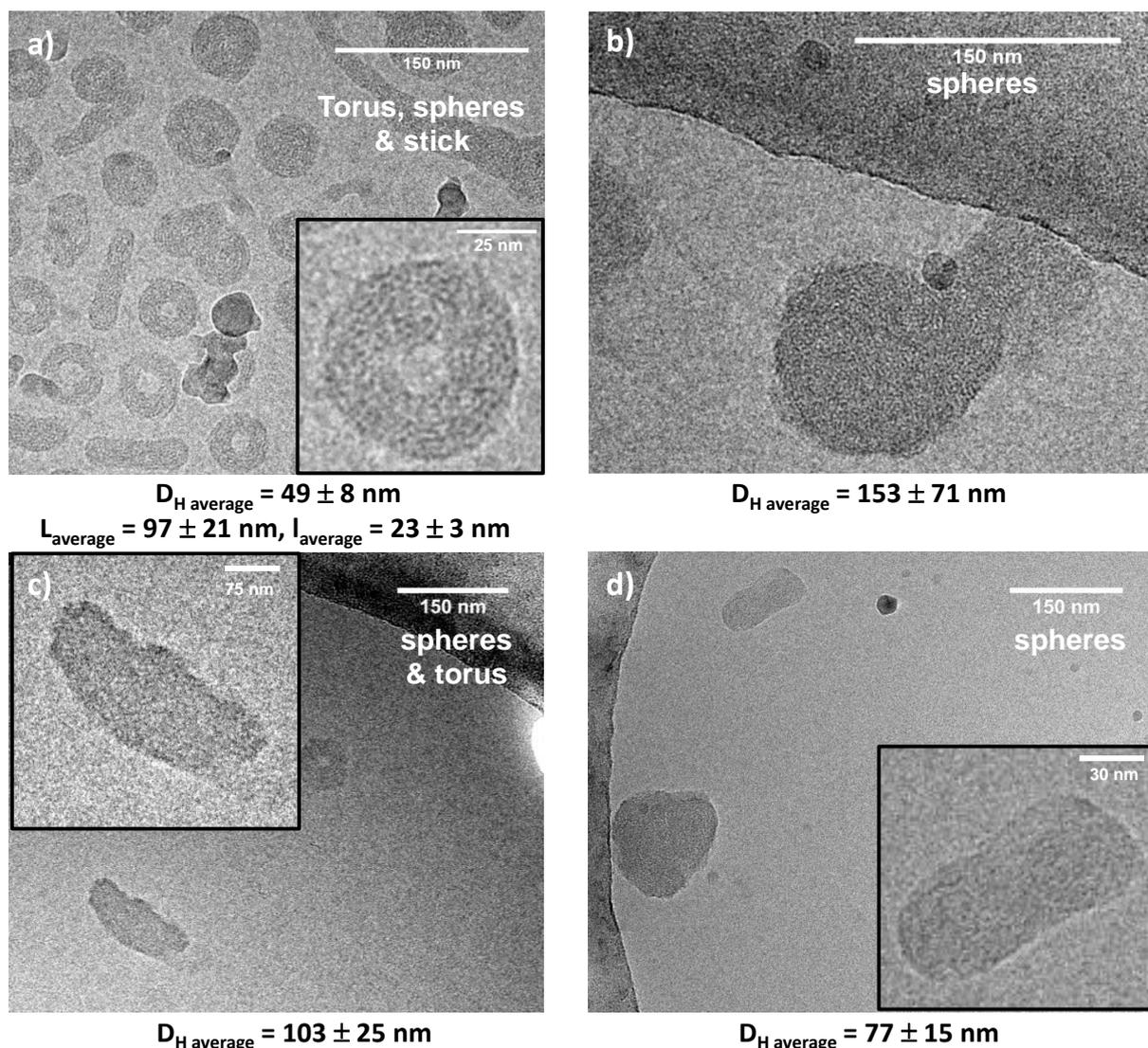


Figure IV.10 : Images Cryo-TEM des polyplexes à base de (a) *IPEI* et (b) copolymère *PEI-b-PiPrOx* obtenus par formulation classique et à base d'un copolymère *PEI-b-PiPrOx* (c) *GwD-F-49* et (d) *GwD-F-45* obtenus par extrusion.

Tout d'abord, les complexes formés par formulation classique avec une *IPEI* 25 kDa (**Figure IV.10.a**) sont organisés sous forme de tores ou de bâtonnets. Les objets ont une taille de $49 \pm 8 \text{ nm}$ de diamètre en moyenne pour les tores et de $97 \pm 21 \text{ nm} \times 23 \pm 3 \text{ nm}$ en moyenne pour les bâtonnets. De plus, comme habituellement observé avec ce type de polymère,²⁰ une organisation interne peut être observée dans le zoom par la présence de « stries » blanches et témoigne d'une forte interaction *ADN_p/polymère*. Les complexes sont donc très stables.

Dans le cas des complexes formulés par formulation classique avec un copolymère *PEI-b-PiPrOx* (**Figure IV.10.b**), une seule population d'objets plus ou moins sphériques est obtenue. Il n'y a plus d'organisation sous forme de tores ou de bâtonnets. De plus, l'organisation interne est moins visible et des complexes de diamètre plus grand sont obtenus en comparaison

aux polymères /PEI. Ces différentes observations sont en lien avec l'ajout du bloc hydrophile PiPrOx et confirme l'hypothèse d'une organisation différente faite précédemment lors de l'étude de l'architecture des polymères.

En ce qui concerne les formulations réalisées par extrusion avec un copolymère (**Figure IV.10.c et d**), des objets plus ou moins sphériques sont également obtenus ainsi que quelques tores. Comme précédemment, la structuration interne des complexes est cependant moins visible.

Les tailles des complexes en fonction du type de formulation peuvent être comparées. Premièrement, les diamètres calculés sur les images Cryo-TEM des complexes réalisés par extrusion avec un copolymère comportant un bloc PEI de 15 kDa (**Figure IV.10.c et d**, 103 ± 25 nm et 77 ± 15 nm respectivement) sont inférieurs à ceux observés dans le cas de la formulation classique avec un copolymère composé d'un bloc PEI de 10 kDa (**Figure IV.10.b**, 153 ± 77 nm). Même dans le cas de la formulation GwD-F-49, réalisée à une concentration en ADN p plus élevée ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) que celle utilisée dans la formulation classique ($0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$), des objets plus petits sont tout de même observés en comparaison à la formulation classique. Enfin, par rapport aux résultats DLS, les diamètres obtenus par Cryo-TEM sont inférieurs dans le cas de GwD-F-49 et identique dans le cas de GwD-F-45. Ces résultats sont en accord avec les observations généralement faites sur des nanoparticules.

II.6. Bilan des conditions expérimentales de l'extrusion

Les études menées sur cette nouvelle technique de formulation montrent un bénéfice en comparaison à la formulation classique. La formation de polyplexes de tailles inférieures à 100 nm est un atout afin de passer plus facilement les différentes barrières biologiques auxquelles sont confrontées les complexes lors des étapes de la transfection. Comme le démontre l'étude de Dong et coll.²¹, dans une gamme de nanogels de PEI de 38 à 167 nm, les meilleurs résultats de transfection sont obtenus avec les nanogels de 75 et 87 nm sur 4 lignées cellulaires différentes.

Pour obtenir les polyplexes les plus petits possibles, il est nécessaire, d'après les études précédentes de respecter certains paramètres permettant d'optimiser la complexation et notamment la formation des complexes primaires en sortie de pore. Le **Schéma IV.1** présente les différents événements de l'arrivée d'un plasmide dans la solution d'ADN. Nous pouvons relier l'impact des paramètres étudiés à ces événements.

En effet, en ce qui concerne les solutions de polymère, un pH acide de 4,5 augmente le nombre de charges positives portées par chaque macromolécule. Ainsi, en comparaison à une formulation à pH 7, le nombre de chaînes macromoléculaires nécessaires à la complexation des plasmides est moins important à pH 4,5. La première étape de la complexation reliée à la constante de vitesse k_1 (**Schéma IV.1.a**) qui s'effectue en sortie de pore est alors modifiée. Si cette constante de vitesse k_1 est trop faible en comparaison de k_2 , la concentration C en plasmide en sortie de pore est supérieure à la concentration d'enchevêtrement C^* (**Schéma IV.1.b**). La complexation qui suivra engendrera alors la formation de polyplexes contenant plusieurs ADN p . Il est donc nécessaire que k_1 soit supérieur à k_2 afin de diminuer la formation de complexes contenant plusieurs plasmides. Diminuer le pH favorise cette complexation plus rapide et nécessitant moins de macromolécules polymères. Les complexes alors obtenus sont plus petits. La limite inférieure de pH est naturellement celle permettant une protonation maximale des fonctions amines des différentes chaînes polymère (à pH 4,5, ce phénomène est pratiquement atteint) tout en évitant de dénaturer le plasmide.

D'autre part, la taille de pore de 30 nm ainsi que la pression de 1 bar permettent de favoriser un étirement plus important du plasmide dans les pores et permettent un flux important de matière en sortie de pore favorisant le mélange des solutions dans le compartiment *trans*. Si ce flux est trop faible, les pores étant proches les uns des autres, les plasmides se placent, en sortie de pore, à une concentration supérieure à C^* (**Schéma IV.1.b**). Les complexes formés par la suite seront donc de tailles importantes. Une seconde contribution du flux de matière en sortie de pore est de permettre aux complexes formés en sortie de pore (**Schéma IV.1.a**) de s'éloigner de la membrane afin de former les nouveaux complexes. Néanmoins, un flux trop importante ne permettra pas la formation de complexes primaires en sortie de pore, mais plus loin dans le compartiment *trans*. Les polyplexes se formeront donc en solution comme lors d'une formulation classique et seront alors de taille importante.

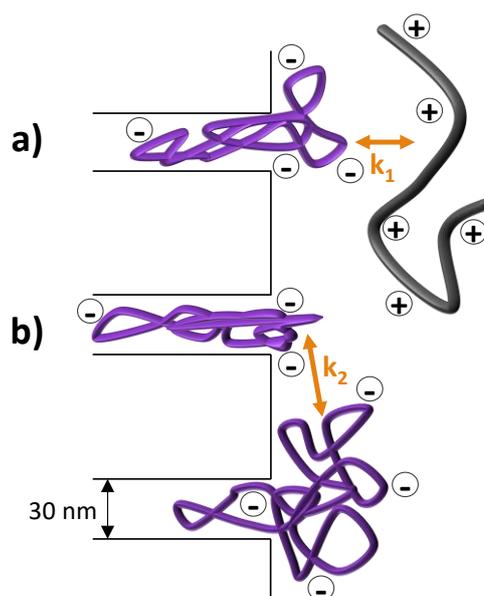


Schéma IV.1 : Illustration schématique de l'ADNp en sortie de pore : (a) complexation avec un polymère dirigée par une constante de vitesse k_1 , (b) interpénétration de deux plasmides ($C > C^*$) dirigée par une constante de vitesse k_2 .

D'autre part, en ce qui concerne les solutions de polyelectrolytes, une attention sera portée au WR. Il est important de réaliser les calculs en fonction du WR_{PEI} et non du $WR_{polymère}$ afin de prendre en compte uniquement la partie permettant une complexation de l'ADN. Un WR_{PEI} minimal de 3 devra être respecté afin d'avoir un excès de motifs EI suffisant pour la complexation des plasmides.

Le choix du polymère impacte également le diamètre des objets obtenus. La fonctionnalisation des chaînes PEI par le couplage avec des polymères hydrophiles (PEI-*b*-POx), des résidus histidine, ou encore du galactose engendre la formation de polyplexes plus grands à un WR_{PEI} égal. Cela a déjà été observé dans le cas de formulations classiques avec des polymères *I*PEI et *I*PEI(his).¹⁹ Néanmoins, ces diverses fonctionnalisations ayant pour but d'améliorer la transfection, il sera nécessaire d'évaluer le bénéfice de ces fonctionnalisations en transfection par rapport à l'augmentation de taille des polyplexes, qui reste parfois modérée.

Enfin, la concentration en ADNp impacte également la taille des polyplexes. La viscosité des solutions de polymère et d'ADN qui est augmentée lors de la formulation à haute concentration ou encore la plus grande quantité de polyplexes par volume peuvent diminuer la répulsion des complexes entre-eux. C'est ce que montre Müller *et al.*²² en 2011. Ils suggèrent en effet que la concentration plus élevée en polyelectrolytes conduit à une diminution de la répulsion électrostatique des complexes primaires et à un grand nombre de complexes primaires

Chapitre 4

par volume. Des complexes secondaires de taille plus importante sont alors obtenus. Cependant, ce paramètre ne peut être optimisé, ce dernier étant imposé selon le type d'analyses biologiques visé (*in vitro* ou *in vivo*).

Partie II. Evaluation biologique des polyplexes

Dans cette deuxième partie, des tests *in vitro* et *in vivo* sont réalisés afin d'évaluer l'efficacité de transfection et la toxicité des nouvelles familles de polymères synthétisées. Les deux techniques de formulation (formulation classique *versus* extrusion) seront également comparées au cours des tests *in vitro*. Nous faisons l'hypothèse initiale que l'ordre d'efficacité de transfection des vecteurs n'est pas influencé par le mode de formulation. Aussi, nous considérons, à cette étape du travail, que les vecteurs performants *in vitro* par formulation classique le sont aussi lorsque la formulation est menée par extrusion. Ce point permet d'éviter un nombre important de formulations qui, dans le cas de l'extrusion, consomme une quantité importante d'ADN p . Nous convenons que des études ultérieures devront étayer ces hypothèses. Enfin, les résultats du précédent paragraphe indiquent que lors de formulations classiques, les concentrations accessibles en ADN p sont très inférieures à 0,5 mg.mL⁻¹ afin d'éviter une précipitation des polyplexes. Pour les tests *in vivo* qui doivent être menés à des concentrations de 0,5 mg.mL⁻¹, seule les formulations par extrusion issues des vecteurs les plus performants mis en évidence par tests *in vitro* seront utilisées.

Pour rappel, la POxylation permise par les copolymères PEI-*b*-PiPrOx présente plusieurs intérêts pour les expériences biologiques. Tout d'abord, l'ajout d'un polymère hydrophile biocompatible réduit la toxicité connue de la PEI.¹⁸ De plus, la formation de polyplexes furtifs a, pour but, lors d'expériences *in vivo*, d'augmenter le temps de circulation des complexes dans l'organisme afin de favoriser la transfection.²³ Ainsi, cette partie cherche à montrer l'apport des nouveaux copolymères PEI-*b*-PiPrOx lors de la transfection des cellules *in vitro* et *in vivo*. Un intérêt sera également porté aux fonctionnalisations histidine et galactose des polymères PEI-*b*-PiPrOx et /PEI témoins.

Dans ce projet, les organes cibles sont les poumons et le foie. Il a été montré dans un précédent chapitre que lors d'injections systémiques, le parcours d'un vecteur passe en premier lieu par le coeur, puis les poumons et ensuite le foie. Le mode d'administration par voie systémique est donc pertinent pour l'objectif du projet. Dans un but d'efficacité et de satisfaction de l'objectif de tests *in vivo*, les tests *in vitro* seront réalisés essentiellement sur des cellules HepG2, cellules d'hépatoblastome humain (cellules cancéreuses du foie). Des tests ultérieurs sur cellules pulmonaires devront être considérés.

Dans les divers tests biologiques, une PEI de M_w 25 kDa fonctionnalisée par l'histidine à 16% (PTG1[®], Polythéragène, Evry, France) est utilisée comme référence.

I. Tests *in vitro*

I.1. Etude des polyplexes de PEI-*b*-POx et /PEI témoins

Avant de mener les tests *in vitro* de cytotoxicité et d'efficacité de transfection, les paramètres physico-chimiques des complexes (électrophorèse et DLS) seront étudiés afin de déterminer les WR_{PEI} permettant une complexation efficace de l'ADN.

I.1.a. Formulation classique des polyplexes

Les polyplexes sont formulés par voie classique à différents WR en PEI selon les conditions habituellement utilisées dans l'équipe.²⁴ Les paramètres de formulation (volumes et concentrations) sont présentés en **Annexe IV.2** pour une /PEI non fonctionnalisée et pour les polymères à base de PEI fonctionnalisés.

I.1.b. Electrophorèse sur gel d'agarose des formulations

I.1.b.i. Principe

Les analyses par électrophorèse sur gel d'agarose sont également nommées « retard sur gel » ou *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) en anglais.

Nous rappelons que cette expérience permet de déterminer si l'ADN p est suffisamment complexé par le polymère au WR utilisé. Une séparation électrophorétique est réalisée sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide sur une période de 30 min. Cette expérience met en jeu les vitesses de migration sous un champ électrique de l'ADN p seul en comparaison à un complexe polymère/ADN p . Ces vitesses sont dépendantes de la charge de surface et de la taille des objets. De l'ADN p non complexé migrera plus vite qu'un complexe polymère/ADN. Afin de permettre un suivi de la migration, un intercalant de l'ADN, le *Sybr safe DNA Gel Stain*, est ajouté dans le gel d'agarose. Lors de son interaction avec les paires de bases de l'ADN, une fluorescence est émise permettant un suivi par UV.

Les différentes formulations, le marqueur de taille standard ainsi que le plasmide libre sont ajoutés dans les puits contenus dans le gel avec ajout d'un tampon de charge (glycérol et bleu de bromophénol). Un champ électrique est appliqué et une migration de la cathode vers l'anode a alors lieu. Après migration, le gel est observé sous UV afin de révéler les différentes bandes de migration.

Pour exemple, la **Figure IV.11** présente le gel obtenu pour les complexes formulés avec un copolymère PEI-*b*-PiPrOx (SAK-4) et du *p*TG11033 en fonction du WR polymère/ADN*p*. La première piste de migration présente le marqueur de taille standard et la dernière piste montre la migration du plasmide seul. Le marqueur (mélange de protéines ou d'ADN de différentes masses molaires) permet de déterminer la masse molaire de ce que l'on fait migrer. Dans cette étude, il n'a pas été exploité

Différents cas peuvent être observés sur les retards sur gel :

- Une bande de migration avec souvent une traînée : l'ADN*p* n'est pas complexé au polymère ou très mal (SAK-4/*p*TG11033 WR = 1/1).
- Un signal de fluorescence est observé dans le puits mais sans migration : l'ADN*p* est complexé au polymère mais l'intercalant peut tout de même interagir avec le plasmide, le complexe ne le protège donc pas totalement (SAK-4/ADN*p* WR = 3/1).
- Aucun signal de fluorescence n'est observé sur la piste : l'ADN*p* est très bien complexé car inaccessible au sein du polyplexe pour l'intercalant (SAK-4/*p*TG11033 WR = 6/1).

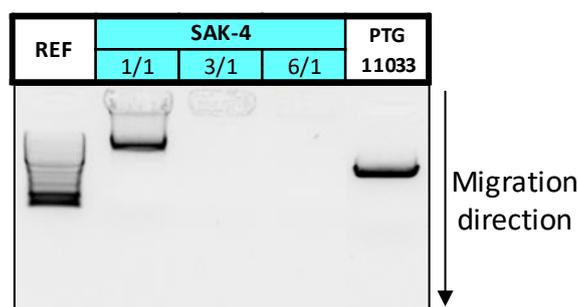


Figure IV.11 : Exemple d'électrophorèse des complexes SAK4/*p*TG11033 à différents WR (1/1, 3/1 et 6/1) avec une référence de masses molaires en piste 1 et l'ADN*p* libre, *p*TG11033, en piste 5.

L'analyse des différentes pistes permet de déterminer le WR polymère/ADN donnant lieu à une bonne complexation de l'ADN*p*. Nous considérons que celle-ci est obtenue lorsqu'aucune migration de plasmide seul n'est observée et que la fluorescence dans le puits reste faible. Pour les tests *in vitro*, les complexes permettant une bonne transfection sont ceux qui complexent correctement l'ADN*p* avec un excès de charges positives en surface. Néanmoins, un excès trop important de polymère peut également être néfaste dû à la toxicité induite par le polymère resté libre en solution. Il est donc nécessaire de ne pas choisir des WR trop élevés pour limiter cette toxicité. D'autre part, une interaction trop forte polymère/ADN

pourrait rendre difficile l'étape de la libération du plasmide dans la cellule diminuant alors l'efficacité de transfection. Ainsi, dans le cas de la **Figure IV.11**, le WR_{PEI} idéal est fixé à 3/1.

I.1.b.ii. Analyses des formulations classiques à partir des PEI-*b*-PiPrOx et PEI témoins

Les complexes formulés à partir des copolymères PEI-*b*-PiPrOx et des polymères *l*PEI présentent des structures différentes comme l'ont démontré les analyses DLS et Cryo-TEM réalisées sur les complexes formulés par extrusion dans la première partie de ce chapitre. Ces structures différentes impliquent donc une complexation différente de l'ADN.

De plus, avant de réaliser des tests de transfection *in vitro*, il est nécessaire de déterminer les WR permettant une complexation efficace. En effet, si la complexation de l'ADN_p est faible, le complexe peut se dissocier avant son entrée dans la cellule. Une efficacité de transfection très faible sera alors mesurée.

Afin de mettre en évidence des différences de complexation et d'évaluer la force d'interaction ADN_p/polymère, les complexes formulés par voie classique (paragraphe **Partie II.I.1.a**) à partir des copolymères PEI-*b*-PiPrOx et des polymères *l*PEI témoins (*i.e* ayant la même masse molaire que celle du bloc PEI dans le copolymère) sont tout d'abord analysés par électrophorèse à des WR de 1/1, 3/1 et 6/1. L'objectif est de déterminer les meilleures conditions de complexation (**Figure IV.12**).

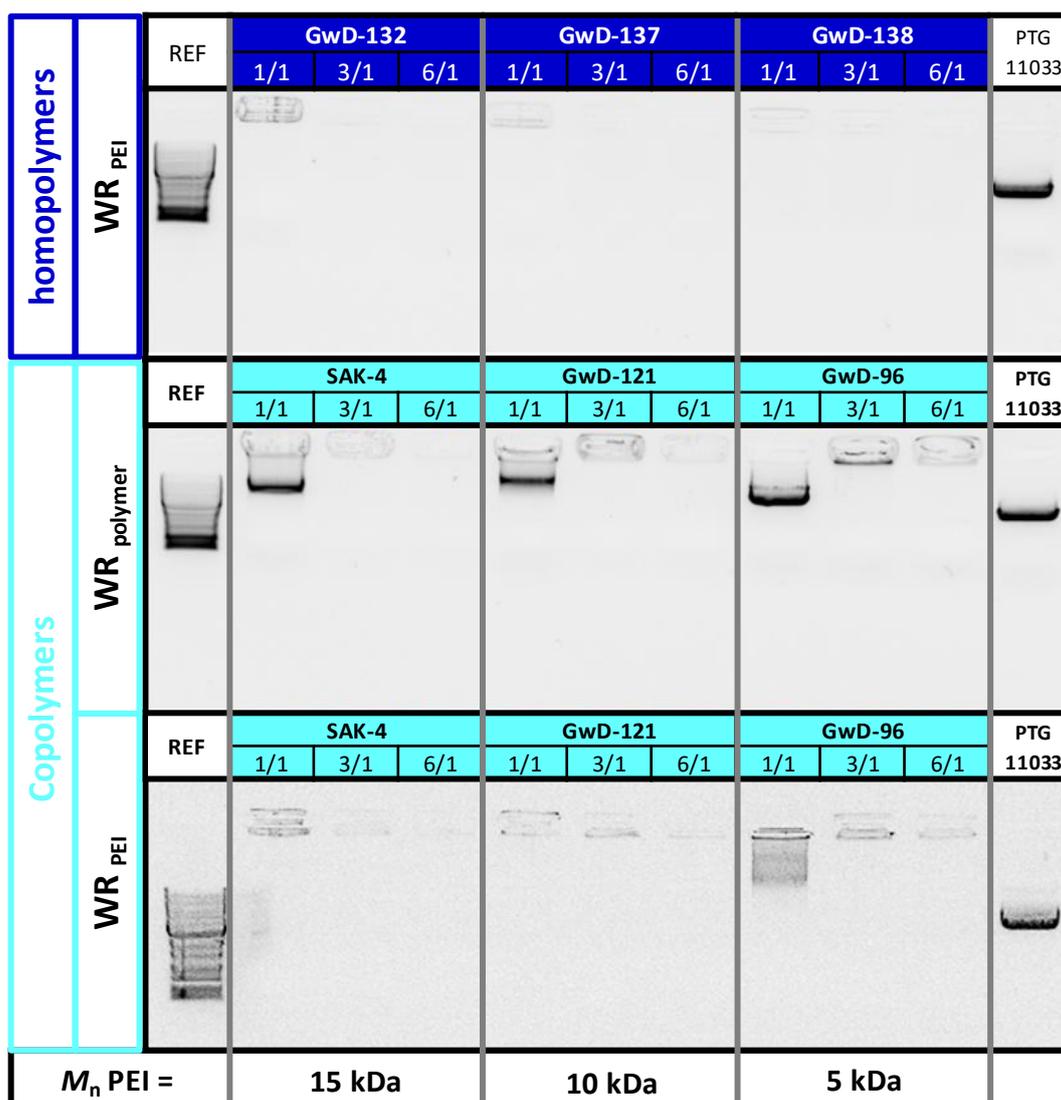


Figure IV.12 : Electrophorèse sur gel d'agarose des polyplexes préparés à partir des PEI-*b*-PiPrOx (WR en polymère total et WR en PEI) et des PEI linéaires témoins.

En ce qui concerne les PEI témoins, aucune migration n'est observée aux différents WR et masses molaires testées: les complexes formés sont le résultat d'une condensation efficace de l'ADN_p. De plus, la fluorescence observée dans les puits est faible et diminue avec l'augmentation du WR. L'intercalant n'interagit pas avec l'ADN_p démontrant que les complexes formés offrent une bonne protection de l'ADN_p.

A propos des copolymères PEI-*b*-PiPrOx, deux séries de formulation ont été réalisées. Dans la 1^{ère}, les WR ont été calculés en fonction de la masse totale du polymère (WR_{polymer}) et dans la seconde, en fonction de la masse de PEI contenue dans le polymère (WR_{PEI}). Les gels d'électrophorèse obtenus sont alors différents : dans le cas des WR_{polymer}, nous observons une mauvaise condensation de l'ADN_p pour les 3 masses molaires à un WR 1/1. Pour les WR 3/1 et 6/1, la condensation de l'ADN_p est plus efficace puisqu'aucune migration n'est observée.

Cependant, un faible signal de fluorescence tout de même présent dans les puits souligne que l'intercalant peut accéder en partie à l'ADN p . Dans le cas des WR_{PEI}, la condensation est plus efficace : pour SAK-4 et GwD-121, aucune migration n'est observée aux trois WR testés. De plus, le signal de fluorescence diminue avec l'augmentation du WR_{PEI} illustrant la meilleure condensation de l'ADN p dans ces conditions. Néanmoins, pour GwD-96, une migration diffuse est observée pour le WR_{PEI} 1/1. En comparaison, son homologue PEI, GwD-138, présente une complexation efficace du plasmide à ce même WR, montrant qu'une PEI de 5 kDa est suffisante pour réaliser cette condensation. Ainsi, dans le cas du copolymère, le bloc PiPrOx limite la complexation du bloc PEI avec l'ADN p . Il est alors nécessaire d'augmenter la quantité de copolymère pour complexer totalement l'ADN p .

Pour conclure, les copolymères PEI-*b*-PiPrOx permettent une condensation de l'ADN p à des WR en PEI similaires aux PEI témoins lorsque la masse molaire du bloc PEI est supérieure à 5 kDa. A cette valeur, une quantité plus élevée de copolymère est nécessaire pour obtenir une complexation efficace car le bloc PiPrOx de 5,7 kDa interfère négativement dans la formation du polyplexe. Cette étude met également en évidence qu'il est pertinent d'utiliser le rapport massique WR_{PEI} au lieu de WR_{polymer} pour comparer les copolymères à leurs homologues PEI.

Les WR_{PEI} 3/1 et 6/1, permettant une bonne complexation de l'ADN p pour les 6 polymères, seront testés *in vitro*.

I.1.c. Taille et potentiel zêta des polyplexes

Comme présenté dans le chapitre 1, des nanoparticules autour de 100 nm sont souhaitées. En effet, des nanoparticules de taille élevée sont plus facilement reconnues par les protéines sériques engendrant leur élimination et sont également filtrées par les différents organes.^{25,26} De plus, l'étude de Dong et coll.²¹ mentionnée précédemment démontre de meilleurs résultats de transfection avec des nanogels de diamètres inférieurs à 100 nm. Il est donc important de caractériser les complexes afin de pouvoir lier les résultats biologiques aux propriétés physico-chimiques des polyplexes étudiés.

D'autre part, la charge de surface des complexes influe également sur l'efficacité du traitement. Un complexe de charge positive permettra une interaction avec les membranes des cellules chargées négativement, cependant cela sera également une contribution à la toxicité. L'ajout d'une couronne hydrophile sera avantageux dans le cas de traitement *in vivo*, car une

augmentation du temps de circulation dans le sang est escomptée. Néanmoins, ces polyplexes furtifs montrent souvent une efficacité de transfection moins intéressante lors des tests *in vitro* justifiée par la diminution du potentiel zêta et donc des interactions avec les cellules.¹⁸ Les complexes formés à partir de PEI-*b*-PiPrOx doivent présenter, d'après la théorie, une couronne hydrophile. Ainsi, l'analyse du potentiel zêta des complexes permettra d'appuyer l'hypothèse de la formation de complexes possédant une couronne de PiPrOx avec ces copolymères.

La **Figure IV.13** représente les analyses de taille par DLS des polyplexes préparés à partir des PEI témoins et des copolymères PEI-*b*-PiPrOx aux WR_{PEI} 3/1 et 6/1 (choisis précédemment par électrophorèse).

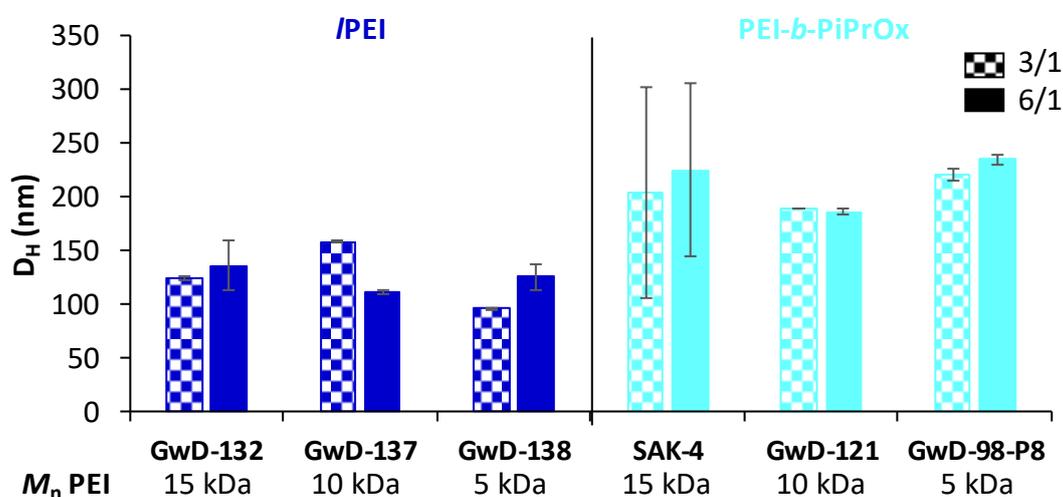


Figure IV.13 : Diamètres hydrodynamiques en intensité des polyplexes préparés par formulation classique au WR_{PEI} 3/1 et 6/1. (DLS = Horiba, 25 °C). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.

Les diamètres hydrodynamiques (D_H) en intensité des polyplexes formulés à partir des PEI témoins de différentes masses molaires sont situés entre 100 et 158 nm et présentent des écarts-types faibles. Les polyplexes à base de PEI-*b*-PiPrOx présentent des diamètres hydrodynamiques entre 180 et 235 nm en fonction de la masse molaire du polymère. Nous notons tout de même un écart-type important pour les complexes à base de SAK-4 témoignant d'une plus grande hétérogénéité des complexes. Les D_H de ces complexes plus élevés que leurs homologues à base de PEI sont justifiés par une condensation de l'ADNp différente par rapport aux complexes /PEI causée par l'ajout d'un bloc hydrophile PiPrOx.

Dans un second temps, le potentiel zêta des complexes a été analysé (**Figure IV.14**). Celui-ci est positif et de l'ordre de 30 à 40 mV pour les complexes formulés avec les PEI témoins, quelle que soit la masse molaire de la /PEI employée. La /PEI (polymère cationique)

étant en excès par rapport à l'ADN_p (macromolécule anionique), la charge de surface des polyplexes est attendue comme positive. Les résultats sont donc en accord avec la théorie. Dans le cas des complexes formés avec la PEI-*b*-PiPrOx SAK-4, le potentiel zêta est du même ordre de grandeur que celui mesuré pour la famille de polyplexe à base de l'PEI. Puis, lorsque la masse molaire du bloc PEI des PEI-*b*-PiPrOx diminue, le potentiel zêta diminue aussi. Nous pouvons conclure que la diminution de la masse molaire du bloc PEI des copolymères PEI-*b*-PiPrOx permet aux chaînes hydrophiles neutres de plus facilement atteindre la surface des polyplexes et d'ainsi jouer le rôle de répulsion stérique que nous leur avons attribué en début de projet. De façon surprenante, un effet de surface est observé en diminuant la masse molaire du bloc PEI, mais aucun effet réel sur les diamètres moyens des polyplexes n'est observé.

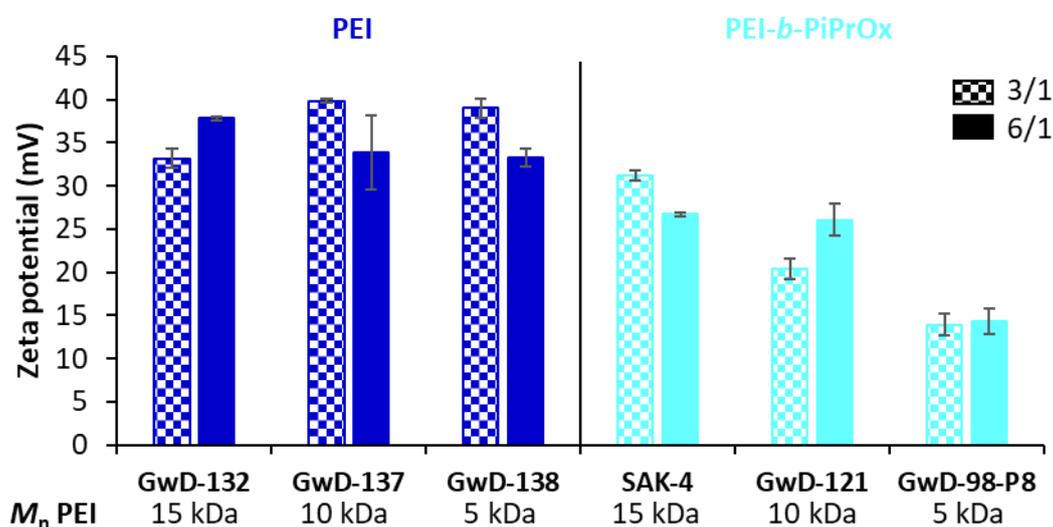


Figure IV.14: Potentiel zêta des polyplexes préparés par formulation classique à des WR_{PEI} de 3/1 et 6/1. (DLS = Horiba, 25 °C). Les écarts types résultent de 3 mesures successives faites sur la même formulation.

Pour conclure sur ces analyses de taille et de potentiel zêta, la présence du bloc hydrophile PiPrOx engendre une complexation différente de l'ADN causant une augmentation de la taille des complexes mais permet une diminution de la charge de surface des polyplexes avec la diminution du ratio PEI/PiPrOx. Les résultats sont donc en accord avec ce qui était attendu. Cependant, la présence des chaînes hydrophiles en surface reste supposée. Des expériences seront nécessaires afin de démontrer la furtivité des complexes comme cela a été réalisé dans le cadre de la stratégie de PEGylation.²⁷

I.1.d. Stabilité des polyplexes

I.1.d.i. Principe

Afin de déterminer la stabilité des complexes, un test de complexation compétitive avec le sulfate de dextrane (**Schéma IV.2**) est réalisé. Ce polysaccharide ramifié de masse molaire élevée (500 kDa) possède des unités galactose liées par des liaisons α -1,6 et des ramifications α -1,3 (ou α -1,2 et α -1,4 de façon plus rare) et une partie de ses fonctions alcool est remplacée par des groupements sulfate. Ses propriétés anioniques en font un compétiteur de l'ADN p en présence de polymères cationiques.

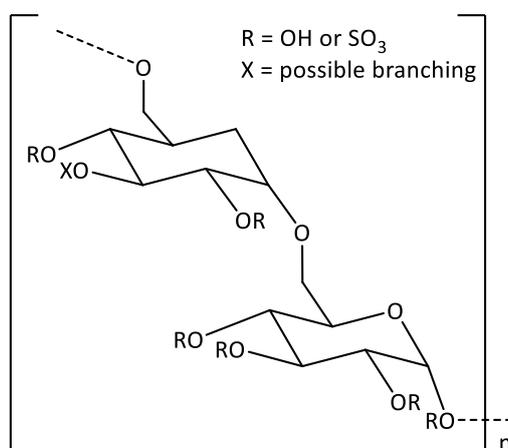


Schéma IV.2 : Structure du sulfate de dextrane.

Le sulfate de dextrane peut être utilisé afin d'évaluer la stabilité du polyplexe et notamment la force d'interaction entre le plasmide et le polymère cationique. Lorsque le polyplexe est exposé à une quantité croissante de sulfate de dextrane, des complexes polymère / sulfate de dextrane se forment libérant de l'ADN p . Puis, lors de l'analyse par électrophorèse des différents mélanges, l'ADN p libéré va pouvoir migrer dans le gel. La fluorescence émise par l'interaction ADN p /intercalant étant proportionnelle à la quantité d'ADN, il est possible de doser le pourcentage d'ADN relargué.

Ainsi, les complexes à base de PEI-*b*-PiPrOx et de lPEI formulés aux WR_{PEI} déterminés précédemment (3/1 et 6/1) ont été incubés en présence de sulfate de dextrane dans une gamme de concentration de 0 à 10 mg.mL⁻¹ pendant 30 min puis analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Pour exemple, la **Figure IV.15** présente le gel obtenu pour les polyplexes formulés à partir du copolymère PEI-*b*-PiPrOx, GwD-96, au WR_{PEI} 3/1, en présence de sulfate de dextrane à une concentration de 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 ou 10 mg.mL⁻¹. Deux références sont présentes

comme précédemment : un marqueur de taille standard ainsi que le pTG11033. En l'absence de sulfate de dextrane, aucune bande de migration n'est observée (cadre rose), le complexe ADN_p/polymère est stable dans ces conditions (2^{ème} puits). Puis, pour les diverses concentrations, nous observons une bande de migration correspondant à du plasmide libre avec une intensité de fluorescence croissante en fonction de la quantité de sulfate de dextrane additionnée (3^{ème} à 10^{ème} puits).

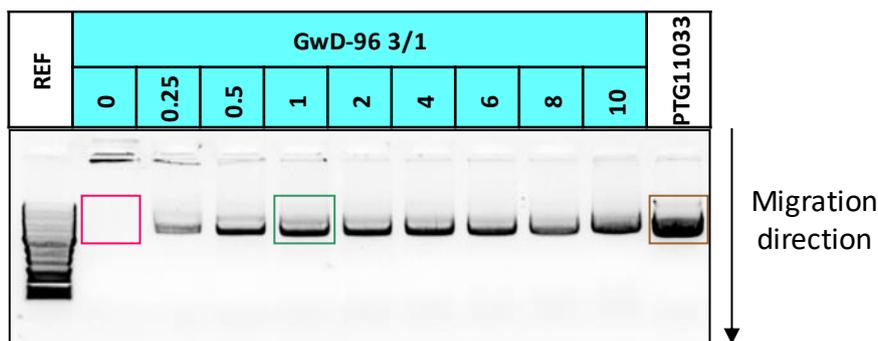


Figure IV.15 : Electrophorèse sur gel d'agarose de polyplexes formulés à partir de PEI-*b*-PiPrOx, GwD-96, en présence de sulfate de dextrane ([sulfate de dextrane] = 0 à 10 mg.mL⁻¹).

Afin de pouvoir tracer la stabilité des polyplexes en fonction de la concentration en sulfate de dextrane, il est nécessaire de quantifier la proportion d'ADN_p relargué en fonction de la concentration en sulfate de dextrane. La fluorescence de la bande de migration aux différentes concentrations est quantifiée par le logiciel ImageJ. Le logiciel calcule une valeur moyenne de l'intensité de gris d'une aire fixée. Ainsi, en comparant l'intensité de fluorescence à une concentration donnée (cadre vert) à celle sans sulfate de dextrane (cadre rose) et à celle du plasmide non complexé (cadre marron), l'**Équation IV.1** peut être écrite. Néanmoins, la capture des images de gels d'électrophorèse peut conduire à des incertitudes et ainsi des artéfacts dans les valeurs. L'expérience pourrait être réalisée en triplicat afin de minimiser les incertitudes.

$$\text{Équation IV.1 : } \% \text{ released } pDNA_{1 \mu\text{g.mL}^{-1}} = \frac{\text{Mean grey value}_{1 \text{ mg.mL}^{-1}} - \text{Mean grey value}_{0 \text{ mg.mL}^{-1}}}{\text{Mean grey value}_{ADNp} - \text{Mean grey value}_{0 \text{ mg.mL}^{-1}}} \times 100$$

Avec ces résultats, le pourcentage d'ADN_p relargué en fonction de la concentration en sulfate de dextrane peut être tracé. Le **Schéma IV.3** présente l'allure générale des courbes obtenues. L'ADN_p est tout d'abord libéré rapidement à faible concentration en sulfate de dextrane puis un palier est atteint. Deux valeurs seront exploitées : la valeur du palier exprimée en pourcentage et la concentration minimale nécessaire pour atteindre ce palier. A haute

concentration, le pourcentage d'ADN p relargué devrait être proche de 100 % ; néanmoins, les expériences montrent que ce n'est pas toujours le cas.

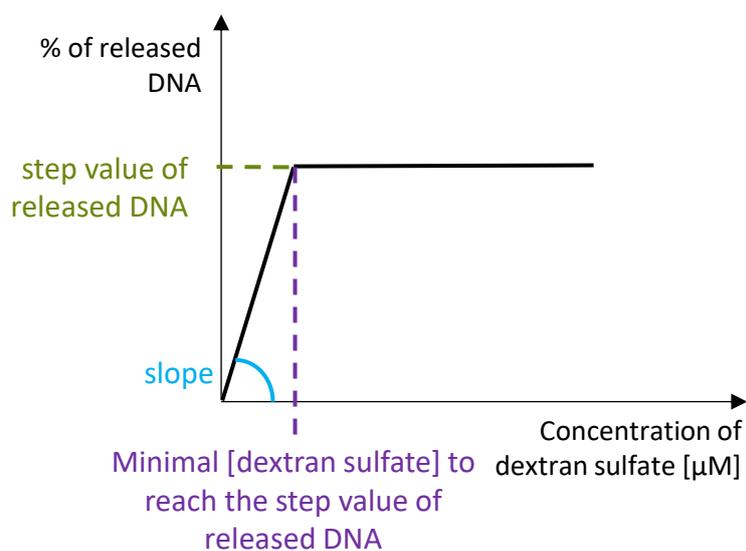


Schéma IV.3 : Représentation d'une courbe du pourcentage d'ADN p relargué en fonction de la concentration en sulfate de dextrane.

I.1.d.ii. Analyses des polyplexes de PEI-*b*-PiPrOx et de IPEI

Les complexes formulés avec les PEI-*b*-PiPrOx et les IPEI présentent, d'après les précédentes études réalisées, des complexations de l'ADN différentes. En effet, il a été mis en évidence des diamètres hydrodynamiques plus élevés dans le cas des complexes à base de copolymères en comparaison aux complexes à base d'homopolymères témoins à un WR_{PEI} identique. Ainsi, nous souhaitons analyser l'énergie cohésive des complexes, c'est-à-dire leur stabilité, en fonction du WR_{PEI} et du polymère utilisé par la complexation compétitive avec du sulfate de dextrane.

Les résultats des expériences de stabilité des complexes formulés avec les PEI-*b*-PiPrOx et les IPEI témoins aux deux WR_{PEI} (3/1 et 6/1) sont présentés dans la **Figure IV.16**.

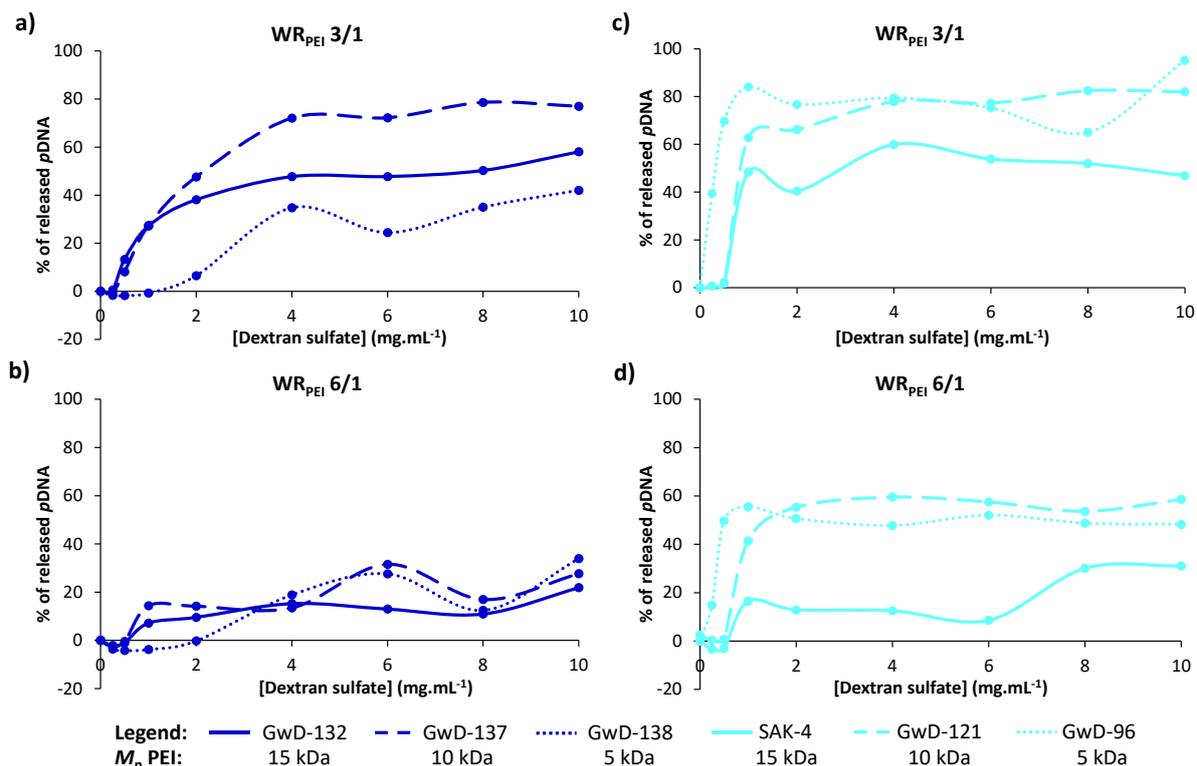


Figure IV.16 : Pourcentage d'ADN p relargué en fonction de la concentration de sulfate de dextrane pour les polymères PEI aux WR_{PEI} (a) 3/1 et (b) 6/1 et pour les copolymères PEI- b -PiPrOx aux WR_{PEI} (c) 3/1 et (d) 6/1.

Pour commencer, les complexes à base d'homopolymères PEI ont été analysés en présence de sulfate de dextrane. Au WR_{PEI} 3/1, pour les 3 masses molaires de PEI, le plateau est atteint pour une concentration en sulfate de dextrane de 4 mg.mL^{-1} . En ce qui concerne les valeurs des plateaux, ceux-ci ne suivent pas l'ordre des masses molaires. La PEI 15 kDa (GwD-132) relargue environ 50 % d'ADN p , la PEI 10 kDa (GwD-137) en relargue 75 % et la PEI 5 kDa (GwD-138) ne permet le relargage que de 40 % de l'ADN p . Le relargage incomplet de l'ADN peut être expliqué par une neutralisation partielle de l'ADN par le polymère même à très haute concentration en sulfate de dextrane empêchant alors sa migration sur le gel d'électrophorèse. L'ordre des plateaux n'a, cependant, pu être expliqué.

Les complexes formulés avec les PEI linéaires au WR 6/1 semblent très stables puisque moins de 30 % de l'ADN p est relargué pour les trois masses molaires étudiées même aux plus hautes concentrations en sulfate de dextrane.

Cette très forte énergie cohésive mise en évidence ici est un phénomène connu pour les complexes à base de PEI linéaires. En effet, Bertrand et al.¹⁹ ont mis en évidence par microscopie une structuration interne linéaire des complexes. Il y a une alternance entre les

chaînes PEI linéaires et les macromolécules d'ADN qui induit une structure très dense et une force cohésive importante. Cela a également été montré par DeRouchey et al.²⁸ par des expériences de décomplexation en présence de NaCl. Les complexes exposés à une concentration croissante en NaCl et analysés par SAXS montrent une très bonne stabilité permise par la structure hexagonale des complexes. Néanmoins, une énergie cohésive trop élevée pourra être néfaste à la transfection car le complexe doit pouvoir se dissocier dans le cytosol afin que le plasmide puisse être exprimé.

Concernant les formulations à base de PEI-*b*-PiPrOx au WR_{PEI} 3/1, le pourcentage d'ADN_p relargué est plus élevé pour le copolymère ayant un bloc PEI de 5 kDa que pour les copolymères possédant un bloc PEI de 10 kDa ou de 15 kDa lorsque la concentration en sulfate de dextrane est de 0,5 mg.mL⁻¹. Ainsi, une masse molaire du bloc PEI plus importante permet une meilleure stabilité des complexes. D'autre part, les plateaux obtenus ne sont pas identiques. Dans le cas de SAK-4 ($M_{n, PEI} = 15$ kDa), l'ADN_p n'est pas complètement relargué même aux plus hautes concentrations en sulfate de dextrane : le palier se situe aux alentours de 50 %. Dans le cas de la masse molaire intermédiaire ($M_{n, PEI} = 10$ kDa, GwD-121), le plateau se trouve aux alentours de 75 %. Enfin pour GwD-96 ($M_{n, PEI} = 5$ kDa), le palier atteint dans ce cas 80 % d'ADN_p relargué. De plus, il est à noter que le palier est atteint à la même concentration en sulfate de dextrane pour les 3 types de polyplexes ([Sulfate de dextrane] = 1 mg.mL⁻¹). Ces paliers sont en accord avec les tests de complexation réalisés précédemment : plus la masse molaire du bloc PEI du copolymère est élevée, meilleure est la complexation (SAK-4 > GwD-121 > GwD-96). Néanmoins, ces paliers sont atteints plus rapidement que dans le cas des complexes à base de /PEI (0,5 mg.mL⁻¹ et 4 mg.mL⁻¹ respectivement).

Dans le cas des formulations au WR 6/1 réalisées avec les copolymères PEI-*b*-PiPrOx (SAK-4, GwD-121 et GwD-96), la même tendance est observée. En effet, pour le polymère GwD-96, un palier à 50 % d'ADN_p relargué est atteint à une concentration en sulfate de dextrane de 0,5 mg.mL⁻¹. Dans le cas de GwD-121, le même palier est atteint cependant il faut une concentration en sulfate de dextrane plus élevée (1 à 2 mg.mL⁻¹). Enfin, pour SAK-4, deux paliers semblent être observés (autour de 15 % pour une concentration en sulfate de dextrane comprise entre 1 et 6 mg.mL⁻¹, puis autour de 30 % pour une concentration de 8 à 10 mg.mL⁻¹). Un relargage faible de l'ADN_p même à haute concentration en sulfate de dextrane est observé. Le même ordre de stabilité est obtenu pour ces complexes au WR 6/1 en comparaison au WR 3/1.

En comparaison aux complexes formés à partir de *l*PEI, les complexes à base de copolymères montrent un relargage plus rapide et plus important. Cela peut être expliqué par une structure interne différente et moins linéaire engendrant une diminution de l'énergie cohésive.

Pour conclure, les complexes formés à partir des PEI-*b*-PiPrOx sont moins stables que les polyplexes de *l*PEI (concentration en sulfate de dextrane plus faible pour arriver au plateau) dû à une structure interne moins cohésive. D'autre part, l'ordre de stabilité des complexes à base de PEI-*b*-PiPrOx suit les observations précédentes : la stabilité des complexes est meilleure (% d'ADNp relargué plus faible) lorsque la masse molaire du bloc PEI est élevée. Cet ordre de stabilité n'est cependant pas retrouvé pour les complexes formulés avec des *l*PEI.

I.1.e. Tests de cytotoxicité (MTT)

I.1.e.i. Principe

Dans le but d'évaluer la cytotoxicité des polymères, un test MTT est mis en place. Le principe de ce test repose sur l'activité des cellules vivantes à la fin du test. En effet, les cellules sont exposées aux différents polymères pendant 48 h, puis leur viabilité cellulaire est analysée. Pour cela, chaque polymère est placé à différentes concentrations et en triplicat sur les cellules. Après les 48 h d'exposition, le réactif bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT, 100 μ L à 5 mg.mL⁻¹) est ajouté dans chacun des puits. Celui-ci sera transformé en formazan par les réductases des mitochondries des cellules viables (**Schéma IV.4**). Cette réaction chimique permet de passer d'un composé jaune, le MTT, à un composé violet, le formazan. Après solubilisation, l'absorbance de la solution est mesurée à 560 nm à l'aide d'un spectromètre, le formazan absorbant à cette longueur d'onde. L'intensité de l'absorbance est alors proportionnelle à la viabilité cellulaire : plus il y a de cellules viables, plus le MTT est transformé en formazan et plus l'absorbance est donc élevée.

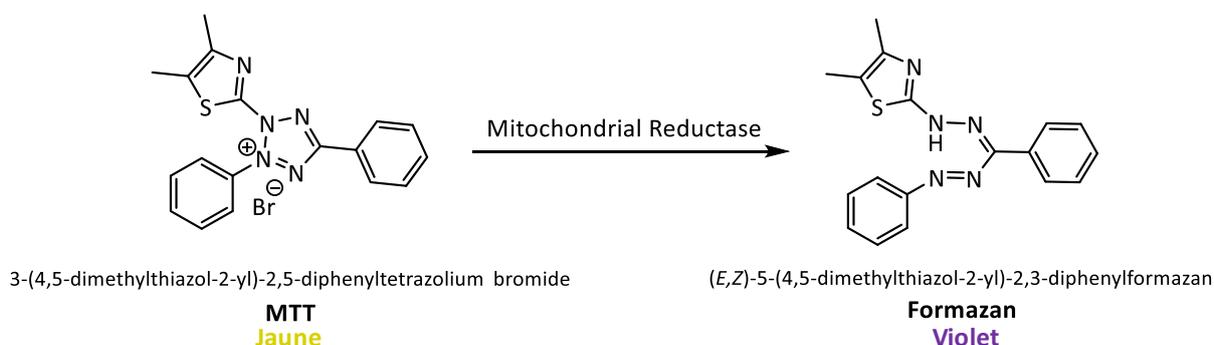


Schéma IV.4 : Réaction de réduction du MTT en formazan.

La toxicité induite par les polymères est ensuite calculée selon l'*Équation IV.2*. L'absorbance des cellules témoins (A_T), non exposées aux polymères, est utilisée comme référence (100 % de viabilité) et comparée à l'absorbance des cellules incubées avec le polymère (A_P).

Équation IV.2 :
$$\text{Toxicity (\%)} = \frac{A_T - A_P}{A_T} \times 100$$

I.1.e.ii. Analyses des polymères

La *IPEI* est, aujourd'hui, le *gold standard* en matière de transfection non virale, cependant, son caractère cationique lui confère une certaine toxicité *in vitro*.¹⁶ D'après ces études, la toxicité est croissante avec la masse molaire de la *IPEI*. Néanmoins, des fonctionnalisations sont étudiées pour améliorer la transfection et ont également montré un intérêt concernant la cytotoxicité comme le montre l'étude de Bertrand *et al.* avec des polymères fonctionnalisés par des résidus histidine. L' IC_{50} (concentration induisant 50 % de toxicité) de ces polymères est supérieur à $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sur cellules HeLa (cellules cancéreuses humaines), HEK293T7 (cellules de rein embryonnaire humain), C2C12 (cellules de myoblastes murins) et Σ CFTE (cellules épithéliales des voies aériennes possédant la mutation homozygote $\Delta F508$ du gène CFTR) alors que la *IPEI* équivalente présente un IC_{50} entre 6,5 et $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ selon la lignée cellulaire. Dans le cas de polymères fonctionnalisés par du PEG, la fonctionnalisation par le bloc hydrophile permet également une diminution de la cytotoxicité.¹⁸

Ainsi, la cytotoxicité des familles *PEI-b-PiPrOx* et leurs homologues *IPEI* synthétisées dans ce projet est analysée afin de connaître l'impact de la fonctionnalisation des chaînes par un bloc *PiPrOx* hydrophile et biocompatible.

Au préalable de ces expériences, la biocompatibilité des polymères *POx* a été étudiée. Pour cela, des analyses de viabilité cellulaire ont été effectuées sur des cellules HeLa et A549 (cellules épithéliales cancéreuses de poumon humain) avec des polymères PEG, *PMeOx*, *PEtOx* et *PiPrOx* de 5 kDa. Les résultats présentés en **Annexe IV.3** expose une biocompatibilité de tous les polymères même à haute concentration (0,11 % W/V).

Les tests de cytotoxicité des polymères *PEI-b-PiPrOx* et des *PEI* témoins ont été réalisés sur des cellules HepG2. Ces cellules d'hépatoblastome humain (cellules cancéreuses du foie) nous intéressent dans ce projet car la transfection du foie et des poumons sont des applications visées. Les polymères ont été testés à différentes concentrations sur les cellules et les résultats sont présentés sur la **Figure IV.17**.

En ce qui concerne les *l*PEI témoins (données en bleu foncé), d'après les données, les IC_{50} des polymères de 5, 10 et 15 kDa sont, respectivement, $< 1 \mu M$, égales à $0,5 \mu M$ et à $0,75 \mu M$. Ces concentrations ne suivent cependant pas l'ordre des masses molaires puisqu'il est, en effet, répertorié une augmentation de la cytotoxicité en fonction de la masse molaire du polymère. Afin, de valider ces informations, il serait nécessaire de réaliser des analyses plus détaillées dans la gamme de concentration 0 à $1 \mu M$.

Néanmoins, ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus avec les PEI-*b*-PiPrOx. Dans le cas de ces polymères portant des blocs PEI de 5, 10 et 15 kDa, les IC_{50} sont, respectivement, $> 9 \mu M$, égales à $1,9 \mu M$ et à $0,75 \mu M$. Une augmentation de l' IC_{50} est donc observée pour les deux composés de plus faible masse molaire traduisant ainsi une diminution de la cytotoxicité des polymères permise par l'ajout d'une partie biocompatible. Le polymère de plus faible masse molaire (GwD-96) présente même une biocompatibilité totale sur la gamme de concentration testée. Dans le cas du polymère de masse molaire élevée (SAK-4), l' IC_{50} est identique à son homologue *l*PEI. La masse molaire du bloc PiPrOx biocompatible n'est pas suffisante pour avoir un impact sur la cytotoxicité.

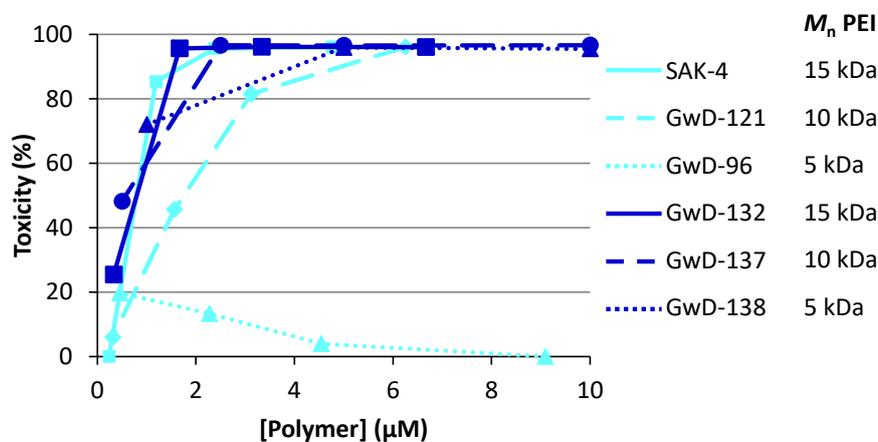


Figure IV.17 : Toxicité sur les cellules HepG2 des polymères PEI-*b*-PiPrOx et *l*PEI témoins en fonction de la concentration molaire en polymère.

Ainsi, la fonctionnalisation par un bloc PiPrOx biocompatible permet de diminuer la toxicité induite par les polycations PEI. De plus, lorsque le ratio $M_n(\text{PEI}) / M_n(\text{PiPrOx})$ diminue avec une $M_n(\text{PiPrOx})$ fixe, une diminution de la toxicité cellulaire est observée. Pour le polymère SAK-4, une masse molaire de PiPrOx plus importante pourrait être testée afin de permettre une diminution de la toxicité.

I.1.f. Tests de transfection (Test RLU)

I.1.f.i. Principe

Afin d'évaluer l'efficacité de transfection sur cellules des polyplexes, un test par spectroscopie est mis au point. Pour cela, le plasmide transfecté doit coder pour un gène rapporteur (gène produisant une protéine ou une enzyme pouvant être quantifiée au laboratoire (fluorescence ou activité enzymatique)). Dans cette étude, le plasmide *pTG11033* codant pour le gène de la luciférase de luciole est utilisé. L'enzyme luciférase produite catalyse l'oxydation de la luciférine en présence d'ATP et d'O₂ selon la réaction du **Schéma IV.5**. Cette réaction crée de la bioluminescence (lumière jaune ici) qui peut être quantifiée.

Pour réaliser ce test, les cellules sont exposées 48 h aux polyplexes puis un kit permettant de quantifier l'activité luciférase (Promega, E1500) est utilisé afin d'analyser l'activité des lysats cellulaires à l'aide d'un luminomètre (LUMAT LB 9507). La lumière émise est quantifiée en photons. Puis, il est nécessaire d'évaluer la viabilité cellulaire puisque la bioluminescence observée sera proportionnelle au nombre de cellules viables. Ainsi la quantité de protéines par puits (proportionnelle à la quantité de cellules viables) est mesurée à l'aide d'un test « protéines BCA ». Puis, la bioluminescence enregistrée précédemment est exprimée en unité de lumière relative par mg de protéines (RLU/mg de protéines).

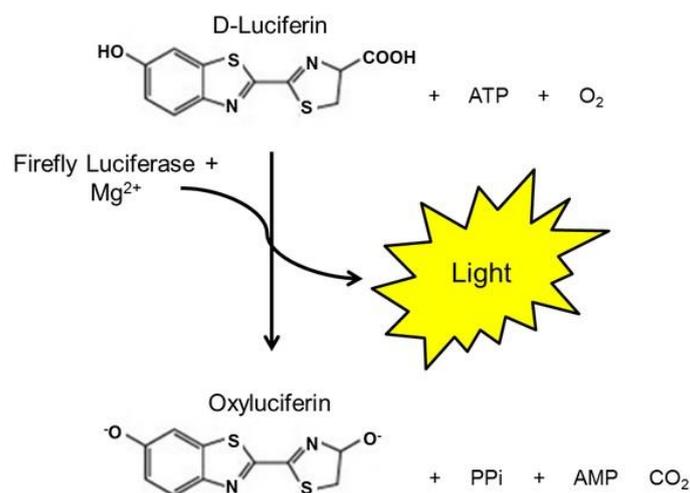


Schéma IV.5 : Réaction de bioluminescence catalysée par l'enzyme luciférase de luciole.²⁹

I.1.f.ii. Résultats

La littérature rapporte une très bonne efficacité de transfection des *IPEI*. Cependant, lors de la fonctionnalisation par des chaînes PEG, il est remarqué une diminution de l'efficacité de

transfection.¹⁸ Ce résultat est expliqué par la diminution du potentiel zêta des complexes menant à une diminution des interactions avec les cellules.

Ainsi, dans le but d'évaluer l'impact de la fonctionnalisation par un bloc PiPrOx des /PEI, des tests de transfection ont été réalisés sur des cellules HepG2 comme pour les tests de viabilité cellulaire. Les polyplexes formulés aux WR_{PEI} 3/1 et 6/1 avec les copolymères PEI-*b*-PiPrOx et leurs homologues PEI ont été testés. La **Figure IV.18** présente les résultats obtenus.

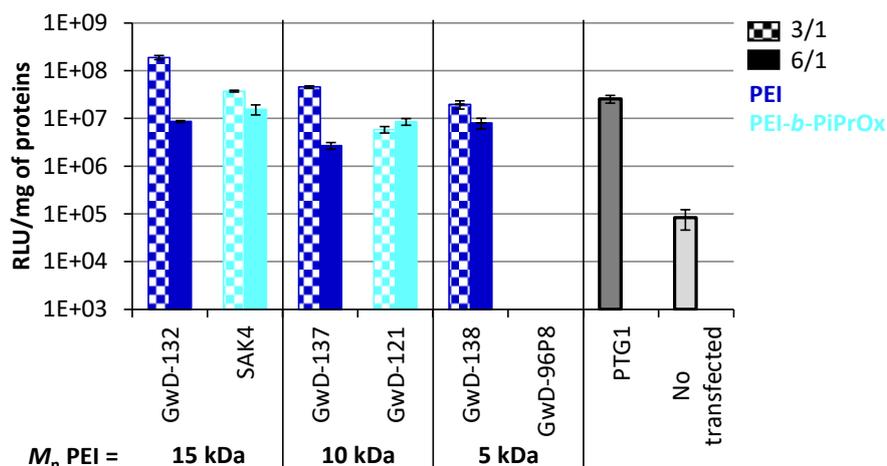


Figure IV.18 : Efficacité de transfection des cellules HepG2 par les polyplexes à base de PEI et de PEI-*b*-PiPrOx à 48 h. (WR_{PEI} = 3/1 ou 6/1 ; 2,5 mg d'ADN *p*TG11033 par puits ; PTG1[®] = /PEI(his), Polythéragène).

Les polyplexes à base de PEI (en bleu foncé) permettent tous une transfection des cellules aux deux WR_{PEI} testés. Néanmoins, au WR_{PEI} 3/1, la transfection décroît avec la masse molaire du polymère. Par rapport au polymère référence (PTG1), la PEI de 15 kDa (GwD-132) permet d'obtenir une transfection plus élevée. Au WR 6/1, la transfection est similaire quelle que soit la masse molaire de la PEI.

Pour les complexes à base de copolymères, nous observons une diminution de la transfection avec la masse molaire du bloc PEI. La transfection est même nulle pour les complexes à base de GwD-96P8. Ce résultat est à relier aux observations précédentes : par électrophorèse, la complexation était moins efficace et le potentiel zêta faiblement positif (+ 15 mV) diminuant alors les interactions entre les complexes et la paroi cellulaire. Néanmoins, les polyplexes réalisés avec le copolymère SAK-4 présentent une transfection similaire à celle de la référence PTG1, et au WR_{PEI} 6/1, celle-ci est même supérieure à la transfection obtenue avec son homologue PEI (GwD-132).

Pour conclure, l'étude en transfection des complexes à base des copolymères PEI-*b*-PiPrOx met en évidence une transfection similaire aux /PEI témoins et à la référence pour les deux masses molaires plus élevées. Une amélioration de l'efficacité de transfection peut même être notée au WR_{PEI} 6/1 en comparaison aux homologues /PEI

Ainsi, il est nécessaire de faire un compromis entre stabilité des complexes, efficacité de transfection et biocompatibilité. En effet, les copolymères de haute masse molaire (SAK-4 et GwD-121) ont montré une complexation stable de l'ADN ainsi qu'une bonne efficacité de transfection. Cependant, l'apport de la fonctionnalisation par le bloc PiPrOx sur la biocompatibilité reste faible pour ces copolymères. L'amélioration de la biocompatibilité est notable pour le copolymère GwD-96, néanmoins, la complexation moins efficace de l'ADN entraîne une efficacité de transfection nulle.

Ces résultats sont liés à l'ajout du bloc hydrophile qui se place en surface des complexes. Néanmoins, l'ajout de cette couronne hydrophile qui augmente la taille des complexes et diminue le potentiel zêta peut limiter les interactions avec la paroi cellulaire nécessaire à l'internalisation et alors limiter la transfection des cellules. C'est pourquoi, la fonctionnalisation de ces nouveaux copolymères est importante afin d'observer une amélioration de la transfection.

1.2. Apport de la fonctionnalisation de /PEI et de PEI-*b*-PiPrOx par des greffons histidine ou galactose

Nous avons pu indiquer précédemment que le choix de ces deux fonctionnalisations est issu de deux stratégies : améliorer la sortie de l'endosome dans le cas de l'histidine (et éventuellement réduire la densité d'énergie cohésive des polyplexes) et améliorer le ciblage vers les cellules pulmonaires ou hépatiques dans le cas du galactose. Un effort particulier a été porté sur une fonctionnalisation dendritique dans ce dernier cas afin d'augmenter les énergies d'interaction galactose-lectine. Les bibliothèques de polymères /PEI(his), PEI(his)-*b*-PiPrOx et PEI-*b*-PiPrOx-Gal ont été utilisées pour réaliser des complexes par formulation classique afin de procéder à l'étude de transfection de ces polyplexes sur des cellules HeLa et HepG2. Les polymères utilisés dans cette partie présentent tous un bloc PEI de 15 kDa puisque ce sont ceux-ci qui ont permis les fonctionnalisations les plus efficaces (Chapitre 3), et le plasmide utilisé est toujours le pTG11033.

I.2.a. Electrophorèse sur gel d'agarose

La fonctionnalisation des polymères *l*PEI modifie le squelette linéaire de ceux-ci et peut donc interférer négativement dans la complexation de l'ADN p . Les complexes formés présentent alors une structure interne différente et une énergie cohésive plus faible. Bertrand *et al.*¹⁹ ont démontré que lors de l'utilisation de *l*PEI fonctionnalisées par l'histidine, des WR plus élevés sont nécessaires pour obtenir une efficacité de complexation comparable aux polymères non fonctionnalisés. Ainsi, la complexation de l'ADN p par les nouveaux polymères fonctionnalisés doit être étudiée.

Comme précédemment, des tests de complexation ont été réalisés par électrophorèse sur gel d'agarose afin d'évaluer les capacités de complexation de chaque polymère. Les trois polymères PEI(his) (GwD-172), PEI(his)-*b*-PiPrOx (GwD-146) et PEI-*b*-PiPrOx-Gal (GwD-148) ont été utilisés pour formuler des polyplexes à des WR_{PEI} de 1/1 à 8/1 d'après le **Tableau IV.16** présent en **Annexe IV.2**. La **Figure IV.19** présente les résultats obtenus.

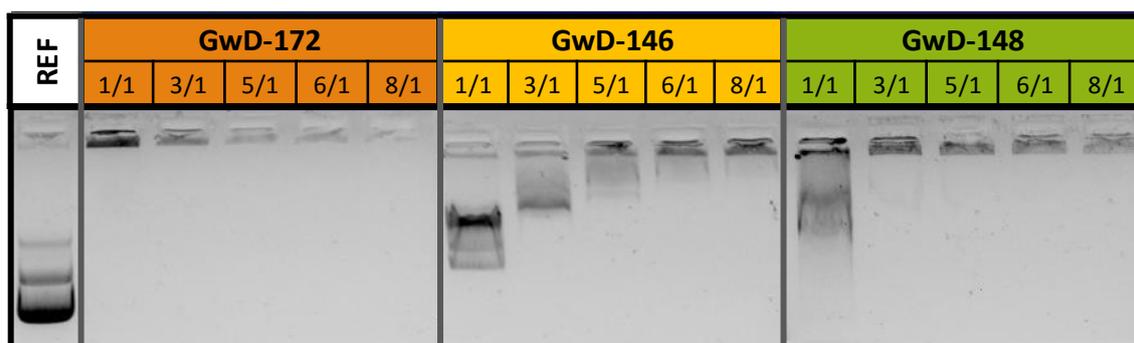


Figure IV.19 : Electrophorèse sur gel d'agarose des polyplexes préparés à partir de PEI(his) (GwD-172), de PEI(his)-*b*-PiPrOx (GwD-146) et de PEI-*b*-PiPrOx-Galactose (GwD-148). (WR_{PEI} de 1/1 à 8/1, M_n PEI = 15 kDa).

Les complexes formulés à partir de la PEI(his) ne présentent aucune bande de migration de l'ADN démontrant une bonne condensation de l'ADN dès le ratio WR_{PEI} 1/1. La fluorescence dans les différents puits diminue avec l'augmentation du WR_{PEI}. L'ADN est alors mieux condensé et protégé à haut WR_{PEI} comme observé précédemment pour les polymères PEI-*b*-PiPrOx et PEI. Par rapport aux polymères non fonctionnalisés (**Figure IV.12**), l'ADN condensé par ces vecteurs est plus accessible aux molécules d'intercalant, puisqu'à WR_{PEI} égaux, une fluorescence plus importante est observée. Cette différence a déjà été observée lors de travaux précédents réalisés par l'équipe.¹⁹ En effet, la fonctionnalisation par l'histidine des polymères diminue la densité de charge du polymère par unité de masse expliquant les WR_{PEI} plus élevés nécessaires pour une complexation efficace de l'ADN. De plus, la diminution de la

structure interne des complexes induite par la diminution de l'énergie cohésive polymère/ADN p implique la formation de complexes moins denses. L'ADN p est alors plus accessible.

Pour la PEI(his)-*b*-PiPrOx (GwD-146), les WR_{PEI} trop faibles ne permettent pas une bonne complexation de l'ADN p puisqu'une migration est observée jusqu'à un WR_{PEI} de 6/1. Au ratio 8/1, une fluorescence est toujours observée dans le puits mais une complexation complète de l'ADN p a lieu puisque la migration de molécules d'ADN p est complètement stoppée, cependant celui-ci est toujours accessible par l'intercalant. Ces résultats peuvent s'expliquer comme précédemment par la diminution de la densité de charge du polymère par unité de masse et l'énergie de cohésion réduite induites par la fonctionnalisation par l'histidine et par le PiPrOx. L'histidine représente, en effet, 40% de la masse du polymère pour GwD-146 et le PiPrOx 16 %.

Enfin, pour la PEI-*b*-PiPrOx-Gal (GwD-148), une migration de l'ADN p est observée uniquement dans le cas du WR_{PEI} 1/1. Les WR_{PEI} supérieurs permettent une condensation de l'ADN plus efficace malgré la fluorescence observée dans les différents puits. Ainsi, le couplage de résidus galactose semble moins perturber la condensation que la modification des chaînes polymère par l'histidine même s'il est également nécessaire d'augmenter les WR_{PEI} pour obtenir une efficacité similaire aux polyplexes non fonctionnalisés.

Cette étude nous permet de déterminer que les ratios WR_{PEI} 3/1 et 6/1 restent les plus pertinents pour les tests *in vitro*. En effet, afin de pouvoir comparer l'efficacité de transfection des polymères fonctionnalisés à celles des polymères non fonctionnalisés, les mêmes WR_{PEI} que pour les polymères non fonctionnalisés ont été choisis malgré la condensation moins efficace à ces WR_{PEI} pour GwD-146.

1.2.b. Tests de cytotoxicité

Les fonctionnalisations sont réalisées dans le but d'améliorer les étapes de transfection et la toxicité induite par les polymères et/ou les complexes. Ainsi, il semble pertinent d'analyser l'impact des fonctionnalisations réalisés sur la viabilité des cellules.

Pour cela, les cellules sont mises au contact des complexes formulés aux WR_{PEI} 3/1 et 6/1 avec les polymères fonctionnalisés (*PEI*(his), GwD-172 ; *PEI*(his)-*b*-PiPrOx, GwD-146 ; *PEI*-*b*-PiPrOx-Gal, GwD-148) pendant 48h puis un test MTT est réalisé. La **Figure IV.20** présente les résultats obtenus.

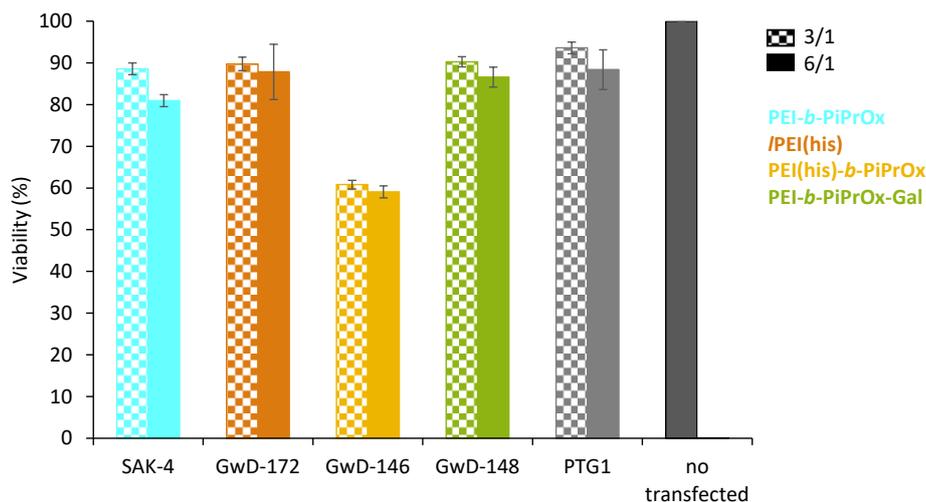


Figure IV.20 : Viabilité des cellules HepG2 en présence des complexes formulés par voie classique à partir des polymères PEI-*b*-PiPrOx (SAK-4), *l*PEI(his) (GwD-172), PEI(his)-*b*-PiPrOx (GwD-146) et PEI-*b*-PiPrOx-Gal (GwD-148) aux WR_{PEI} 3/1 et 6/1.

Dans le but de pouvoir comparer les résultats aux bibliothèques de copolymères PEI-*b*-PiPrOx et *l*PEI précédemment étudiées, un copolymère non fonctionnalisé, PEI-*b*-PiPrOx, SAK-4, est utilisé ici comme référence aux expériences précédentes.

De faibles toxicités sont observées pour les complexes formulés à partir de la référence non fonctionnalisée (SAK-4) ainsi que ceux à base de polymères *l*PEI(his) (GwD-172) et PEI-*b*-PiPrOx-Gal (GwD-148). La toxicité étant liée aux chaînes libres en solution,³⁰ une toxicité plus élevée est observée pour les WR_{PEI} 6/1 dû au plus grand nombre de chaînes polymères non complexées.

Le polymère PEI(his)-*b*-PiPrOx (GwD-146) présente, cependant, une toxicité de 40 % aux deux WR_{PEI} utilisés. La mauvaise complexation de l'ADN par ce polymère mise en avant lors des analyses par électrophorèse suggère une plus grande quantité de chaînes polymère libres alors responsables de la toxicité observée.

I.2.c. Tests de transfection

Comme mentionné précédemment, les fonctionnalisations galactose et histidine ont pour but d'améliorer la transfection notamment lors de l'entrée dans la cellule et de la sortie de l'endosome respectivement. Ainsi, dans cette partie, l'efficacité de transfection des complexes réalisés à partir des *l*PEI(his), PEI(his)-*b*-PiPrOx et PEI-*b*-PiPrOx-Gal est évaluée (**Figure IV.21**).

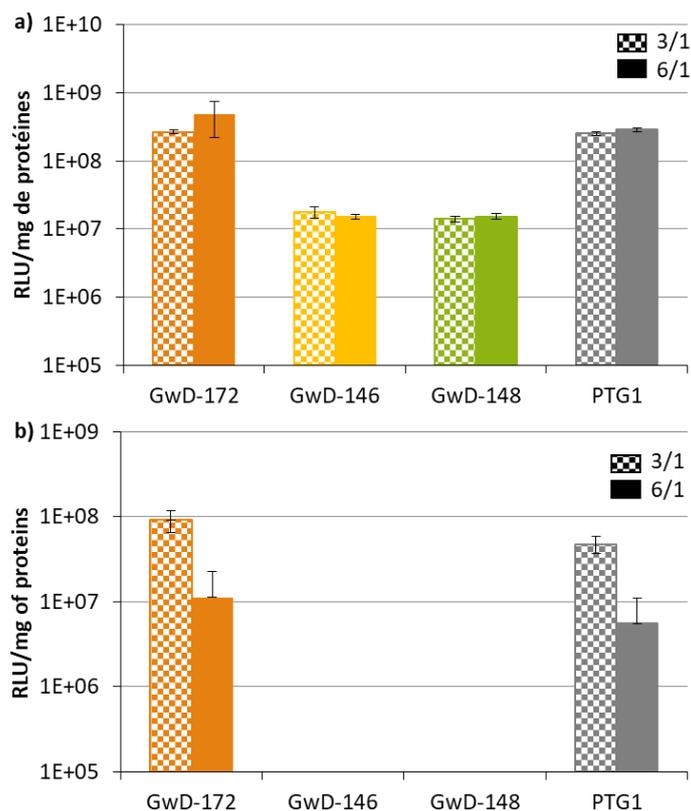


Figure IV.21 : Efficacité de transfection des polyplexes à base de PEI(his) (GwD-172), de PEI(his)-*b*-PiPrOx (GwD-146) et de PEI-*b*-PiPrOx-Galactose (GwD-148) sur (a) des cellules HeLa et (b) des cellules HepG2 ($WR_{PEI} = 3/1$ ou $6/1$, $1 \mu\text{g}$ d'ADN par puits ; PTG1[®] = *l*PEI(his), Polythéragène).

La première étude est menée sur des cellules HeLa dépourvues de récepteurs au galactose et représentant une référence dans le cadre de cette étude. Quel que soit le polymère étudié, une transfection sur les cellules HeLa est observée (**Figure IV.21.a**). Les complexes à base de *l*PEI(his) présentent une transfection légèrement supérieure à celle de la référence PTG1 (PEI(his) commerciale, M_w PEI = 25 kDa). Néanmoins, les polyplexes formulés avec les copolymères fonctionnalisés par l'histidine ou par le galactose transfectent moins bien que la référence. Dans le cas des copolymères fonctionnalisés par l'histidine (GwD-146), la complexation faible mise en évidence aux WR_{PEI} utilisés explique ces résultats. En ce qui concerne les complexes à base de polymères fonctionnalisés par le galactose (GwD-148), la couronne hydrophile apportée par le bloc PiPrOx diminuant les interactions avec les membranes cellulaires peut justifier ce résultat.

Afin d'évaluer l'apport de la fonctionnalisation par le galactose sur la transfection, ces complexes ont également été testés sur des cellules HepG2 comportant des récepteurs au galactose (**Figure IV.21.b**). Une transfection est observée comme précédemment pour les complexes formulés avec les polymères *l*PEI(his) et est légèrement supérieure à la transfection

observée pour la référence PTG1. Néanmoins, dans le cas des copolymères fonctionnalisés par l'histidine ou le galactose, une transfection nulle est reportée. En ce qui concerne la fonctionnalisation par l'histidine, comme précédemment, la mauvaise complexation de l'ADN p d'une part, et l'hypothèse de la formation d'une couronne de PiPrOx autour de chaque polyplexe ne permettent pas l'entrée des complexes dans la cellule. Ce résultat est surprenant car une transfection est observée dans le cas des cellules HeLa. Nous attribuons cette différence de comportement à la nature différente des cellules testées. Pour les complexes formulés avec les PEI-*b*-PiPrOx-Gal, nous avons fait l'hypothèse de la formation de polyplexes entourés d'une couronne de PiPrOx elle-même décorée par des unités galactose permettant un ciblage cellulaire. Les résultats de transfection négatifs sur HepG2 indiquent que les unités galactose ne sont pas disponibles pour jouer le rôle de ligands sur les cellules HepG2. Une analyse de l'enchaînement carboné formé lors de la fonctionnalisation des polymères met en évidence la création d'une zone hydrophobe par un enchaînement hydrocarboné de neuf carbones et de deux souffres diminuant alors la solubilité des unités galactose pouvant être enfouies dans un volume hydrophobe et réduisant ainsi leur accessibilité. La transfection n'est donc pas efficace.

Pour conclure, les efficacités de transfection des copolymères fonctionnalisés ne sont pas à la hauteur des résultats attendus. Les solubilités des polymères GwD-146 et GwD-148 n'étant pas optimales dans l'Hepes et dans l'eau, ce paramètre doit être étudié plus en détail afin de formuler des polyplexes complexant de façon efficace l'ADN pour permettre la bonne complexation de l'ADN p et une transfection accrue des cellules.

1.3. Comparaison formulation classique/extrusion

Cette dernière partie de tests *in vitro* est consacrée à la comparaison de complexes réalisés par formulation classique ou par extrusion. En effet, la formulation par extrusion étant peu connue, il est nécessaire d'évaluer l'impact du mode de formulation sur la complexation et sur l'efficacité de transfection des complexes en comparaison à des formulations classiques.

Ces expériences ont été réalisées avec des polymères de PEI linéaires fonctionnalisés par l'histidine comprenant une masse molaire en PEI de 7,6 et 15,9 kDa (AF7 et PLL131 respectivement). Ces polymères ont été choisis pour leur capacité de transfection comparable à la référence commerciale d'après de précédentes études réalisées au laboratoire.¹⁴ Les formulations par extrusion ont été réalisées à des WR 3/1 en polymère (GwD-F-12 avec AF7 et GwD-F-13 avec PLL131) et les formulations classiques à divers WR en polymère (1/1, 3/1, 6/1). Les complexes formulés par voie classique sont réalisés selon le **Tableau IV.16** présent

en **Annexe IV.2**. Pour les deux formulations réalisées par extrusion, le **Tableau IV.13** présente les paramètres de formulation.

Tableau IV.13 : Paramètres de formulation et analyses DLS des extrusions réalisées à partir de *I*PEI(his) avec un bloc PEI de 7,6 et 15,9 kDa (AF7 et PLL131 respectivement) à un WR_{polymer} 3/1.

Run	DNA solution		Polymer solution				Extrusions parameters			Polymer/DNA			DLS analysis		
	[DNA] ¹ μg.mL ⁻¹	V mL	PEI	%PEI ²	[polymer] mg.ml ⁻¹	V mL	Ø nm	P bar	[DNA _{trans}] th mg.mL ⁻¹	WR ³ polymer	WR ⁴ PEI	N/P ⁵	D _{Hn} ⁶ (nm)	D _{Hi} ⁷ (nm)	PDI
GwD-F-12	71.4	0.56	AF7	0.64	0.32	0.24	30	2	0.05	3	1.9	14.6	136	203	0.13
GwD-F-13			PLL131	0.62	0.31	0.24				3	1.9	14.3	117	180	0.15

Solvent for DNA and polymer solution : Hepes 10 mM

¹ DNA used = pTG11033

² %PEI = $M_{n \text{ PEI th}} / M_{n \text{ polymer}}$

³ WR_{polymer} = mass of polymer / mass of DNA

⁴ WR_{PEI} = mass of polymer × %PEI / mass of DNA

⁵ N/P = moles of EI_{total} / moles of phosphate

⁶ D_{Hn} = D_H obtained by DLS in number

⁷ D_{Hi} = D_H obtained by DLS in intensity

I.3.a. Electrophorèse sur gel d'agarose

Afin d'évaluer la complexation de l'ADN_p en fonction du mode de formulation, une analyse par électrophorèse des formulations réalisées par voie classique (WR_{polymer} 1/1, 3/1 et 6/1) ou par extrusion (WR_{polymer} 3/1) à partir des deux *I*PEI(his) de différentes masses molaires ($M_{n \text{ PEI}} = 7,8$ et $15,9$ kDa, AF7 et PLL 131 respectivement) a, tout d'abord, été réalisée. La **Figure IV.22** présente les résultats obtenus.

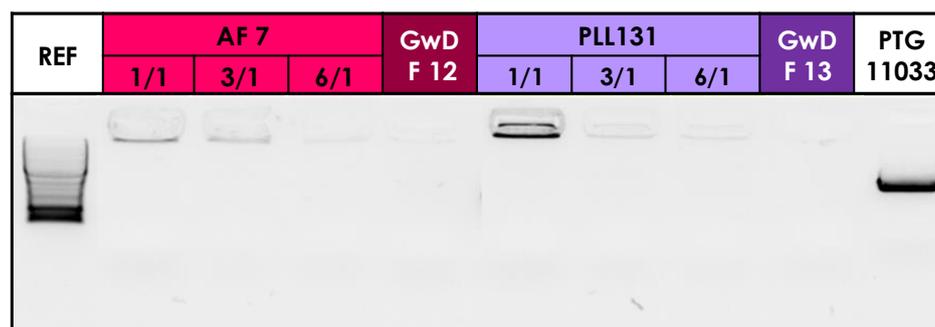


Figure IV.22 : Electrophorèse sur gel d'agarose des polyplexes préparés à partir de AF7 (*I*PEI(his), $M_{n \text{ PEI}} = 7,6$ kDa) par formulation classique aux WR_{polymer} 1/1, 3/1 et 6/1 ou par extrusion à un WR_{polymer} 3/1 (GwD-F-12) (en rose clair et foncé) et à partir de PLL 131 (*I*PEI(his), $M_{n \text{ PEI}} = 15,9$ kDa) par formulation classique aux WR_{polymer} 1/1, 3/1 et 6/1 ou par extrusion à un WR_{polymer} 3/1 (GwD-F-13) (en violet clair et foncé).

Tout d'abord, pour les deux polymères, la complexation de l'ADN est totale quel que soit le WR_{polymer} utilisé ou la méthode de formulation.

Pour les complexes formulés par extrusion au $WR_{\text{polymer}} 3/1$, aucune fluorescence n'est observée démontrant une très bonne complexation de l'ADN. En comparaison, les formulations réalisées au même WR_{polymer} par formulation classique montrent un léger signal de fluorescence (AF7 et PLL131 au $WR_{\text{polymer}} 3/1$). La condensation est donc moins forte lors de formulations classiques puisque l'intercalant peut accéder en partie à l'ADN.

Ainsi, la formulation de complexe par extrusion permet, d'après ces résultats, d'obtenir des complexes plus condensés que par formulation classique.

D'autre part, pour les tests sur cellules, les complexes par voie classique seront testés aux $WR_{\text{polymer}} 3/1$ et $6/1$ comme précédemment, le $WR_{\text{polymer}} 1/1$ montrant une complexation moins importante de l'ADN p .

I.3.b. Tests de transfection

La complexation étant très efficace dans le cas d'une formulation par extrusion, l'évaluation de l'efficacité de transfection s'est révélée importante. En effet, une trop forte interaction polymère/ADN p pourrait être néfaste à la libération du plasmide dans le cytosol et donc à l'expression de celui-ci par la cellule.

Les efficacités de transfection de ces complexes obtenus par formulation classique étant connues sur des cellules HepG2 suite à de précédentes études de l'équipe, les analyses de ces deux séries de complexes (par formulation classique ($WR_{\text{polymer}} 3/1$ et $6/1$) ou par extrusion ($WR_{\text{polymer}} 3/1$), avec les polymères AF7 ou PLL131, ont été effectuées sur ces cellules. La **Figure IV.23** présente les résultats obtenus avec les deux polymères selon le type de formulation des complexes.

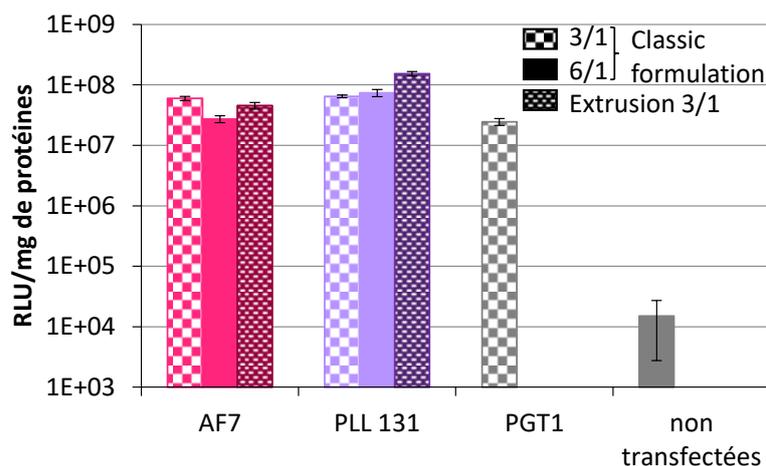


Figure IV.23 : Efficacité de transfection sur cellules HepG2 des polyplexes préparés à partir de *PEI*(his) de deux masses molaires (AF7, M_n PEI = 7,6 kDa et PLL131, M_n PEI = 15,9 kDa) par formulation classique (WR_{polymer} 3/1 et 6/1) ou par extrusion (WR_{polymer} 3/1). (2,5 μg d'ADN par puit, *pTG11033*).

Dans le cas des complexes formulés avec le polymère AF7, une efficacité de transfection très similaire est obtenue quelle que soit le mode de formulation et le WR_{polymer} utilisé. Pour les complexes à base de PLL131, la formulation par extrusion permet une amélioration de la transfection en comparaison à la transfection obtenue par formulation classique aux deux WR_{polymer} . De plus, en comparaison à la référence commerciale, PTG1, une amélioration de presque 1 log est observée.

Ainsi, la complexation plus importante de l'ADN *p* lors de la formulation par extrusion n'est pas un frein à la transfection des cellules.

Pour conclure, ces expériences permettent de mettre en avant la méthode de formulation par extrusion. En effet, nous avons démontré que l'extrusion permet l'obtention de complexes plus petits (partie 1.II.2.d) et avec une meilleure condensation de l'ADN que les formulations classiques. De plus, les propriétés biologiques du plasmide sont conservées puisqu'une efficacité de transfection similaire aux complexes formulés par voie classique est obtenue *in vitro*. Ces résultats importants et prometteurs permettent donc d'envisager l'utilisation de cette méthode de formulation pour les études *in vivo* pour lesquelles des complexes de petites tailles et présentant une bonne efficacité de transfection sont nécessaires.

II. Tests *in vivo*

Actuellement, les thérapies géniques non virales ne sont pas commercialisées dû à un manque d'efficacité en comparaison aux thérapies virales. Dans le cas du transfert de gènes à base de polyplexes, diverses limites sont apparues telles qu'une toxicité des vecteurs cationiques, la taille trop élevée des polyplexes, un temps de circulation faible dans l'organisme, la faible concentration en ADN pouvant être injectée, ou encore la faible capacité à pénétrer dans la cellule^{31,32}.

Le développement de la formulation par extrusion dans la première partie de ce chapitre a permis l'obtention de solutions stables de complexes inférieurs à 200 nm et à une concentration en ADN de 0,5 mg.mL⁻¹. Ce résultat tout à fait nouveau ouvre des perspectives inédites dans le domaine des essais *in vivo*, puisque c'est à notre connaissance la première fois qu'il est possible de réaliser des polyplexes stables à base de *l*PEI (par exemple) à des concentrations en plasmide équivalentes à celles utilisées pour les thérapies virales. Ce résultat ouvre naturellement la voie à des essais de transfection *in vivo* sur petits animaux afin d'évaluer le potentiel de ces polyplexes en cas d'administration systémique, par exemple. De plus, des améliorations du potentiel de transfection des vecteurs à base de *l*PEI peuvent être escomptées par les multiples fonctionnalisations réalisées sur les polymères par l'ajout d'un bloc hydrophile (amélioration de la furtivité des complexes⁶), le greffage de résidus histidine (amélioration de l'échappement de l'endosome¹⁹) et, enfin, par le greffage bifonctionnel de dérivés galactose pour permettre un ciblage cellulaire³³. Ces diverses modifications et la formulation par extrusion permet la formation de complexes multifonctionnels inspirés de la machinerie des virus.

L'ensemble de ces conditions ouvrent en effet la voie à des tests *in vivo* véhiculant une quantité d'ADN comparable à celle des thérapies virales³⁴ *via* des complexes multifonctionnels pouvant dépasser les barrières biologiques habituellement rencontrées.

Ainsi, dans cette partie, des tests *in vivo* préliminaires ont pu être menés. Les différentes bibliothèques de polymères synthétisés au cours de ce manuscrit et d'une précédente étude ont été utilisées : polymères de type *l*PEI, *l*PEI(his), PEI-*b*-PiPrOx, PEI(his)-*b*-PiPrOx, PEI-*b*-PiPrOx-Gal et *star*PEI. Les complexes formulés par extrusion à deux concentrations différentes en ADN_p (0,28 mg.mL⁻¹ et 0,55 mg.mL⁻¹) seront testés lors d'expériences de transfection sur souris. L'ensemble des formulations est conduit de façon à générer des solutions de nanoparticules stables se rapprochant des 100 nm. En effet, nous avons précédemment observé

que, même lors d'extrusion, les diamètres moyens des polyplexes augmentent sensiblement avec la concentration en plasmide.

II.1. Formulation des polyplexes par extrusion

Pour rappel, les formulations sont réalisées suivant les paramètres mis au point dans la première partie de ce chapitre à savoir une pression de 1 bar, une membrane contenant des pores de 30 nm, une solution de polymère à pH 4,5 et un WR_{PEI} 3/1.

Pour évaluer les avantages des fonctionnalisations des polymères mises au point au cours de ce manuscrit lors d'analyses *in vivo*, des complexes ont été formulés par extrusion avec le pTG11033 en faisant varier divers paramètres :

- L'architecture du polymère (linéaire ou étoile)
- La masse molaire du bloc PEI (5, 10 ou 15 kDa)
- La fonctionnalisation du polymère (PiPrOx, histidine ou galactose)
- La concentration en ADN (0,28 ou 0,55 mg.mL⁻¹, C1 et C2 respectivement)

Le **Tableau IV.14** présente les conditions de formulations réalisées à un WR en PEI de 3/1. La concentration en ADN des solutions de complexes a été évaluée par NanoDrop (celle-ci est à analyser avec précaution, les fonctionnalisations des polymères pouvant fausser l'absorption à 260 nm et donc fausser la concentration en ADN).

De plus, il est à noter qu'une solution concentrée de glucose est ajoutée avant l'injection dans l'animal afin d'obtenir des solutions à 5 % en glucose et ainsi respecter l'équilibre osmotique. Les analyses DLS présentées sont celles réalisées après l'ajout de cette solution de glucose afin d'être représentatives des complexes administrés aux souris.

Les formulations réalisées selon les paramètres déterminés dans la partie 1 de ce chapitre permettent l'obtention de complexes d'un diamètre hydrodynamique en nombre compris entre 73 et 350 nm. Ces tailles sont tout à fait en accord avec les valeurs précédemment obtenues et permettent d'envisager des injections *in vivo*.

Plus précisément, comme lors des études à faibles concentrations en ADNp réalisées dans la première partie de ce chapitre, l'influence des fonctionnalisations, des masses molaires ou encore de la concentration peut être analysée ici.

Tout d'abord, lors des formulations GwD-F-59 et GwD-F-61 réalisées avec des lPEI (PLL118) ou des lPEI(his) (PLL131) à 0,28 mg.mL⁻¹ (C1), une augmentation de la taille des

complexes est observée avec la fonctionnalisation par l'histidine (+ 26 nm) comme lors de la formulation à faible concentration en ADN p (0,05 mg.mL⁻¹, partie I de ce chapitre). Néanmoins, à haute concentration (C2, GwD-F-60 et GwD-F-62), la variation est inversée : une diminution de la taille des complexes est observée avec la fonctionnalisation (- 48 nm). Cependant, aucune explication n'a pu être trouvée.

Dans le cas de formulation avec des PEI en étoile de 16,1 kDa à 0,28 mg.mL⁻¹ en ADN p (PLL 113, C1 ; extrusion GwD-F-63), une diminution de la taille des complexes est observée en comparaison aux *l*PEI de même masse molaire, PLL118 (97 et 103 nm respectivement). Néanmoins, à haute concentration, une augmentation de 48 nm est observée entre GwD-F-60 (PEI étoile, PLL118, C2) et GwD-F-64 (*l*PEI, PLL113, C2). De même, lors de l'utilisation de PEI en étoile de 8,1 kDa (PLL117), les complexes obtenus sont de taille plus élevée que lors de l'utilisation d'une *l*PEI de 15,9 kDa (PLL118) aux deux concentrations. Ainsi, dans le cas de ces polymères, il serait intéressant de réaliser des expériences d'électrophorèse à ces concentrations en ADN p afin de vérifier la complexation efficace. De plus des expériences de stabilité avec du sulfate de dextrane pourrait apporter des informations complémentaires.

D'autre part, nous pouvons nous intéresser aux complexes réalisés à partir de copolymères PEI-*b*-PiPrOx (SAK-4, GwD-121 et GwD-98). A basse concentration (C1), l'effet du PiPrOx est notable pour la formulation GwD-F-93 réalisée avec le copolymère de faible masse molaire (GwD-98). Dans ce cas, le bloc PiPrOx peut réellement recouvrir la surface. La furtivité des complexes permet d'empêcher l'agrégation des complexes et limite ainsi la taille des complexes finaux (73 nm contre 103 nm avec une *l*PEI de 15,9 kDa ; PLL188). Dans le cas des formulations à 0,5 mg.mL⁻¹ en ADN p (C2), des complexes compris entre 116 et 137 nm sont obtenus selon le copolymère utilisé. En comparaison aux complexes réalisés à partir de la *l*PEI PLL 118 (180 nm), une diminution des diamètres hydrodynamiques est observée. L'ajout du bloc PiPrOx montre son intérêt : la présence de chaînes hydrophiles en surface des complexes permet de diminuer l'agrégation des polyplexes à forte concentration même si celle-ci ne recouvre pas toute la surface (notamment pour SAK-4 qui a faible concentration en ADN p montre un potentiel zêta identique aux homopolymères *l*PEI comme présenté dans la partie I de ce chapitre).

Ainsi, la structure en étoile ne permet pas de diminuer la taille de complexes à haute concentration en ADN p . D'autre part, l'ajout du bloc hydrophile semble important à ces concentrations. En effet, à la concentration C2, des complexes plus petits sont obtenus avec les différents copolymères en comparaison à la *l*PEI. Ce résultat est contraire aux analyses réalisées

à faible concentration. Cela démontre que, lorsque la quantité de polyplexes par unité de volume devient importante, il est nécessaire de mettre en œuvre des stratégies limitant l'agrégation des complexes notamment grâce à la furtivité des complexes.

Pour terminer, nous pouvons nous intéresser aux complexes formulés avec les copolymères fonctionnalisés par l'histidine (SH-02, formulation GwD-F-67 et GwD-F-98) ou par le galactose (GwD-148, formulations GwD-F-97 et GwD-F-98). Dans le cas des polymères fonctionnalisés par l'histidine, des tailles comparables à celles obtenues dans le cas du copolymère SAK-4 de même masse molaire en PEI sont obtenues. L'histidinyltion ne semble donc pas interférer dans la complexation ici contrairement aux tests à faible concentration réalisés avec ce polymère. Cela n'a cependant pas pu être expliqué ici. Dans le cas de la fonctionnalisation par le galactose, des complexes de tailles plus élevées sont obtenus (293 et 350 nm en fonction de la concentration contre 124 et 118 nm pour les complexes à partir du copolymère non fonctionnalisé, SAK-4). La zone hydrophobe créée par l'enchaînement carbone dont nous avons déjà discuté peut expliquer ces tailles plus élevées.

Ainsi, les différents polymères ont permis l'obtention de complexes stables concentrés en ADN p permettant d'envisager les tests *in vivo*. La structure PEI-*b*-PiPrOx est à mettre en avant ici puisque ces polymères ont permis l'obtention des complexes de plus petites tailles aux différentes concentrations. Cependant, la couronne hydrophile en surface pourrait diminuer les interactions avec les cellules lors de la transfection et limiter l'efficacité de transfection. Un regard particulier sera donc porté à ces copolymères et leurs fonctionnalisations avec l'attente d'une transfection accrue.

Tableau IV.14 : Conditions et analyses des formulations par extrusion réalisées pour les expériences *in vivo*.

Run		DNA solution		Polymer solution					[DNA] trans (th) mg.mL ⁻¹	Polymer/DNA			DLS analysis			[DNA] nanodrop µg.mL ⁻¹	
		[DNA] _{th} ¹ mg.mL ⁻¹	V µL	Polymer	M _n PEI kg.mol ⁻¹	%PEI ²	[PEI] mg.mL ⁻¹	Solvent		V µL	WR ³ polymer	WR ⁴ PEI	N/P ⁵ EI	D _n ⁶ nm	D _i ⁷ nm		PDI
GwD-F-59	C1	0.39	0.56	PLL118	15.9	100	2.5	Hepes 10mM pH 4,5	0.24	0.28	3	3	23	103	215	0.21	141
GwD-F-60	C2	0.79	0.56											5	0.55	180	274
GwD-F-61	C1	0.39	0.56	PLL131	15.9	62	2.5	Hepes 10mM pH 4,5	0.24	0.28	4.8	3	23	129	207	0.16	182
GwD-F-62	C2	0.79	0.56											5	0.55	122	225
GwD-F-63	C1	0.39	0.56	PLL113	16.1	100	2.5	Hepes 10mM pH 4,5	0.24	0.28	3	3	23	97	197	0.23	122
GwD-F-64	C2	0.79	0.56											5	0.55	228	309
GwD-F-95	C1	0.39	0.56	PLL117	8.1	100	2.5	Hepes 10mM pH 4,5	0.24	0.28	3	3	23	119	219	0.23	171
GwD-F-96	C2	0.79	0.56											5	0.55	293	997
GwD-F-65	C1	0.39	0.56	SAK-4	15	72	2.5	Hepes 10mM pH 4,5	0.24	0.28	4.2	3	23	124	225	0.24	253
GwD-F-66	C2	0.79	0.56											5	0.55	116	252
GwD-F-91	C1	0.39	0.56	GwD-121	10	63	2.5	Hepes 10mM pH 4,5	0.24	0.28	4.8	3	23	118	210	0.23	310
GwD-F-92	C2	0.79	0.56											5	0.55	126	266
GwD-F-93	C1	0.39	0.56	GwD-98	5	47	2.5	Hepes 10mM pH 4,5	0.24	0.28	6.4	3	23	73	227	0.41	432
GwD-F-94	C2	0.79	0.56											5	0.55	137	305
GwD-F-67	C1	0.39	0.56	SH-02	15	52	2.5	Hepes 10mM pH 4,5	0.24	0.28	5.8	3	23	110	216	0.20	253
GwD-F-68	C2	0.79	0.56											5	0.55	141	234
GwD-F-97	C1	0.39	0.56	GwD-148	15	72	2.5	Hepes 10mM pH 4,5	0.24	0.28	4.2	3	23	293	405	0.25	177
GwD-F-98	C2	0.79	0.56											5	0.55	350	586

Solvent DNA Hepes 10 mM, Solvent polymer solution: Hepes 10 mM pH 4,5

¹ DNA used = pTG11033² %PEI = $M_{n\text{ PEI th}} / M_{n\text{ polymer}}$ ³ WR_{polymer} = mass of polymer / mass of DNA⁴ WR_{PEI} = mass of polymer x %PEI / mass of DNA

Extrusion parameters : P = 1 bar, Ø = 30 nm,

⁵ N/P = moles of EI unit / moles of phosphate base⁶ D_{Hn} = D_H obtained by DLS in number⁷ D_{Hi} = D_H obtained by DLS in intensity

II.2. Evaluation biologique des polyplexes sur souris

II.2.a. Mode d'administration

Divers modes d'administration des traitements sont possibles. Nous pouvons citer la voie orale, intramusculaire, intraveineuse ou encore par aérosol.

Afin de choisir la voie d'administration la plus judicieuse dans le cadre de ce projet, intéressons-nous aux organes ciblés. Les maladies telles que la mucoviscidose ou encore l'hémophilie sont l'objectif de ce projet. En effet, la fonctionnalisation des polymères par le galactose a pour but, comme déjà mentionné, de permettre la transfection des cellules pulmonaires et hépatiques. Dans ce cadre, afin de permettre une irrigation maximale de ces organes lors de l'administration des complexes, deux voies d'administration sont envisagées. La première, pour viser les poumons, est une administration par aérosol. La deuxième, pour arriver au foie, est l'injection par voie intraveineuse. En effet, pour rappel, Bertrand et Leroux³⁵ déterminent le trajet de traitements administrés par voie intraveineuse : le premier organe rencontré sera le cœur puis les poumons. Puis, le volume sanguin sera distribué dans les organes dont le foie.

L'administration par aérosol demande cependant de grands volumes de solution de complexes concentrées en ADN et permet d'envisager uniquement un ciblage du poumon. Ainsi, l'administration par voie intraveineuse sera utilisée dans le cadre de cette étude. C'est à dire l'injection de 200 μL de solution concentrée dans la veine caudale de souris.

II.2.b. Principe

Afin d'évaluer l'efficacité *in vivo* des complexes fonctionnalisés, des tests de transfection sur souris ont été réalisés. Pour cela, les complexes réalisés dans le **Tableau IV.14** vont être utilisés afin d'évaluer l'impact des fonctionnalisations.

Pour la fonctionnalisation par le bloc PiPrOx, un meilleur temps de circulation et une plus faible opsonisation sont attendus dans le but de permettre une efficacité de transfection plus élevée et sur un temps plus long.⁶ Dans le cas d'une fonctionnalisation par l'histidine, une amélioration de l'expression du gène est également attendue par l'augmentation de la quantité d'ADN ρ libéré dans le cytosol.¹⁹ Les polymères fonctionnalisés par le galactose ont, eux, pour objectif d'améliorer les interactions avec les cellules afin d'augmenter l'internalisation cellulaire des complexes et donc la transfection.³³ Enfin dans le cas des polymères en étoile, la

structure plus dense doit permettre une meilleure stabilité des complexes et une réduction de la cytotoxicité induite par le traitement.³⁶

200 μ L de complexes formulés par extrusion sont injectés aux souris par voie intraveineuse dans la queue. Pour chaque type de complexes, le test est réalisé en quintuplet : cinq souris reçoivent le même traitement afin de pouvoir faire une moyenne. De plus, un lot de 5 souris reçoit une solution ne contenant pas de complexes (soit une solution d'Hepes 10 mM + 5 % glucose).

Lors de ces expériences, comme pour les tests *in vitro*, il est nécessaire de quantifier la transfection. Pour cela, le même type de test peut être mis en œuvre. En effet, le même plasmide étant utilisé, en présence de luciférine, les cellules transfectées peuvent catalyser la synthèse de l'oxyluciférine émettant ainsi une bioluminescence. 24 h après l'injection, les souris reçoivent une injection intrapéritonéale de luciférine. 4 min après cette injection, les animaux sont anesthésiés pour être imagés (IVIS Lumina II, Perkin Elmer, France). La bioluminescence émise est alors enregistrée et exprimée en photons par seconde. La mesure est réalisée pour la face postérieure et antérieure de la souris. Ce processus est répété à 48 h et éventuellement à 8 jours.

II.2.c. Résultats

Les souris ont reçu les formulations réalisées selon le **Tableau IV.14**. Ces complexes sont formulés à partir des polymères /PEI, /PEI(his), PEI(his)-*b*-PiPrOx, PEI-*b*-PiPrOx-Gal et *star*PEI. La transfection a été évaluée par mesure de la bioluminescence des faces antérieures et postérieures et les résultats sont présentés sur la **Figure IV.24**.

La bioluminescence moyenne enregistrée pour les 5 souris ayant reçu la même formulation, ainsi que l'écart type entre les différents animaux, sont représentés. Il est à noter que si la bioluminescence est nulle pour les 3 jours d'analyse, cela signifie que les individus n'ont pas survécu au traitement et qu'aucune analyse n'a donc été réalisée. De plus, pour certains lots, la bioluminescence a été observée uniquement à J1 et J2, il n'y a donc pas de données pour J8 dans ce cas. Lorsque des décès ont été enregistrés, ceux-ci sont survenus quelques heures après l'injection, ainsi une absence de données sur les trois jours est synonyme de décès alors que l'absence de données à J8 signifie que les individus ont survécus mais n'ont pas été imagés.

Tout d'abord, divers polymères présentent une toxicité importante ayant engendré le décès des souris. La PEI linéaire de 16 kDa, PLL-118, est toxique aux deux concentrations testées : les cinq animaux de chaque lot n'ont pas supporté le traitement. La littérature mentionne l'injection de complexes à base de PEI sans toxicité accrue,³⁷ cependant deux différences sont à noter. Premièrement, la concentration en ADN plus faible utilisée par Ito *et al.* (0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) induit une quantité plus faible de polymère injectée. De plus, leurs complexes étant très polydispersés, une très grande partie est rapidement éliminée par l'organisme. Ainsi, les complexes de petites tailles ne représentant que 10 % en volume, ils ne permettent pas une efficacité de transfection comparable à celle des virus. Dans notre cas, les complexes injectés étant petits (103 et 180 nm respectivement pour les concentrations de 0,28 et 0,55 mg.mL^{-1}), homogènes et à plus forte concentration en ADN_p, une augmentation de l'efficacité de transfection était attendue. Une hypothèse pouvant expliquer la forte toxicité observée est la quantité de PEI libre trop importante ainsi que la charge positive de surface des complexes très nombreux qui induit la déstabilisation des membranes cellulaires. Nous concluons que la toxicité cellulaire déjà rapportée pour la lPEI ne peut être palliée par un « effet de dilution » intrinsèque à des expériences *in vivo*, même si les tailles des polyplexes injectés sont en adéquation avec l'ensemble des exigences dans le domaine de la vectorisation. Cet essai corrobore les suspicions concernant l'utilisation de la lPEI en thérapie génique.

D'autre part, l'apport de la modification par l'histidine de la lPEI a pu être analysé lors de nos expériences. Cette fonctionnalisation permet une diminution importante de la toxicité *in vitro* et une augmentation de l'échappement de l'endosome.¹⁹ Ainsi, les complexes à partir de lPEI(his) sont attendus comme moins toxiques en comparaison aux précédents complexes. Cette analyse est confirmée par les résultats observés lors de ces essais *in vivo*. A faible concentration (C1, 0,28 mg.mL^{-1}), deux souris n'ont pas survécu au traitement mais les 3 souris ayant survécu montrent la meilleure efficacité de transfection à J1 (5,94.10⁶ ph.s⁻¹ et 3,23.10⁶ ph.s⁻¹ pour les faces antérieures et postérieures respectivement). Les résultats montrent, cependant, également une toxicité à haute concentration puisque les cinq souris n'ont pas survécu (PLL131, C2). Les polymères lPEI(his) permettent donc d'augmenter l'efficacité de transfection par la libération d'une plus grande quantité de plasmide dans le cytosol. Cependant, cette plus grande quantité d'ADN_p libérée engendre également la libération d'une plus grande quantité de chaînes polymère libres alors responsables de la toxicité observée.³⁰ Ainsi, malgré la fonctionnalisation par l'histidine et les bons résultats *in vitro*, la quantité de polymère pouvant être injectée reste limitée. A cette concentration (C1), nous nous plaçons légèrement en-dessous

de l'IC₅₀. A J2, la bioluminescence diminue à $2,27.10^5$ ph/s pour la face antérieure soit une bioluminescence 26 fois inférieure à J1. Cela est lié au type de plasmide transfecté qui contient un promoteur CMV permettant une expression transitoire du gène.

Dans le but de réduire la toxicité des polymères libres en solution, l'influence de la structure du polymère a été étudiée. Les complexes à partir de PEI en étoile ou de copolymères PEI-*b*-PiPrOx fonctionnalisés ou non ont été testés lors de ces expériences *in vivo*. Une diminution de la toxicité a été observée puisque les diverses solutions de complexes ont été supportées par les souris.

Quelques formulations peuvent être mises en avant par leur efficacité de transfection supérieure à la bioluminescence enregistrée à J1 pour les souris n'ayant reçu aucun traitement (lot témoin, ligne rouge). Ainsi, les polyplexes à base de PEI en étoile de 15,9 kDa, PLL-113, et de copolymère PEI-*b*-PiPrOx de 15 kDa, SAK-4, présentent une bioluminescence à J1 supérieure avec une amélioration de celle-ci en fonction de la concentration. Pour la PEI en étoile de 15,9 kDa (PLL113), les bioluminescences enregistrées pour la face antérieure sont 1,4 et 2,2 fois supérieures au lot témoin lorsque [ADN]_{th} est respectivement de $0,28 \text{ mg.mL}^{-1}$ (C1) et $0,55 \text{ mg.mL}^{-1}$ (C2). Pour la PEI-*b*-PiPrOx (SAK-4), les bioluminescences sont 1,5 et 2,5 fois supérieures. Ainsi, l'architecture des polymères en étoile ou l'ajout d'un bloc hydrophile à la /PEI permet l'injection de solutions concentrées en ADN_p et donc en polymère sans induire de toxicité accrue. De plus, malgré une diminution de la transfection en comparaison aux polymères /PEI(his) (PLL131), la transfection est supérieure au lot de souris témoins. Ces résultats sont en accord avec les analyses *in vitro* réalisées précédemment : l'architecture permet de diminuer la toxicité des polymères tout en conservant une transfection.

Pour les polymères en étoile, une autre masse molaire a été testée : PLL117, 8 kDa. Le traitement est bien toléré par les animaux cependant, l'efficacité de transfection est plus faible à haute concentration notamment à J1. Les complexes étant de taille plus élevée (119 et 293 nm à $0,28$ et $0,55 \text{ mg.mL}^{-1}$ contre 97 et 228 nm à $0,28$ et $0,55 \text{ mg.mL}^{-1}$ pour la PEI en étoile de 15,9 kDa), une opsonisation plus importante des complexes peut avoir lieu et ainsi expliquer cette diminution de la transfection. En ce qui concerne les copolymères PEI-*b*-PiPrOx, deux autres masses molaires ont pu être testées pour le bloc PEI : 10 et 5 kDa, GwD-121 et GwD-98 respectivement. Pour ce dernier, l'expression du gène reste très faible puisqu'une bioluminescence comparable à celle des souris non traitées est enregistrée. Les complexes de ces polymères (SAK-4, GwD-121 et GwD-98) ayant tous des tailles inférieures à 140 nm pour les concentrations à $0,28$ et $0,55 \text{ mg.mL}^{-1}$, l'élimination de ces traitements par l'organisme doit

être similaire. Ainsi, les paramètres pouvant justifier ce résultat sont la complexation moins efficace observée pour ces polymères ainsi que les potentiels zêta plus faibles diminuant les interactions avec les cellules. Pour GwD-121, nous pouvons observer, à faible concentration, une bioluminescence intéressante 1,8 fois supérieure aux souris témoins. Ainsi, un résultat intéressant était attendu pour la concentration plus élevée. Cependant, les souris n'ont pas supporté ce traitement. Aucune explication ne peut expliquer ce résultat, les masses molaires plus élevée et plus faible ayant bien été acceptées.

Pour résumé, en ce qui concerne l'architecture des polymères, la structure en étoile ou comportant un bloc hydrophile PiPrOx permet une diminution de la toxicité ainsi qu'une expression du gène véhiculé. Les masses molaires en PEI conduisant aux meilleurs résultats de transfection sont de 16 kDa pour les polymères en étoile et entre 15 et 10 kDa pour les polymères PEI-*b*-PiPrOx.

Pour finir, dans le but d'améliorer les performances du copolymère PEI-*b*-PiPrOx ayant démontré les meilleurs résultats de transfection sans toxicité (SAK-4), les complexes à base de polymères fonctionnalisés par l'histidine ou par le galactose (SH-02 et GwD-148 respectivement) ont été testés sur les souris. Cependant, les résultats de bioluminescence ne montrent pas d'amélioration de la transfection par rapport aux souris témoins. Dans le cas des polymères fonctionnalisés par l'histidine, SH-02, les complexes sont de petites tailles (110 et 140 nm selon la concentration en ADN utilisée), néanmoins la complexation moins efficace observée lors des tests *in vitro* peut expliquer ce résultat. Pour terminer, les complexes à base de GwD-148 étant de taille plus élevée (293 nm et 350 nm), l'opsonisation des complexes par l'organisme est plus rapide conduisant à une diminution de l'efficacité et peut expliquer ce résultat non concluant.²⁵ De plus, comme vu précédemment *in vitro*, la faible accessibilité du galactose causée par l'espaceur hydrophobe ne permet pas le ciblage cellulaire attendu.

Ainsi, pour conclure sur ces premières expériences *in vivo*, les résultats de transfection les plus élevés sont obtenus avec la lPEI(His). Toutefois, nous observons que cette efficacité de transfection est accompagnée d'une toxicité élevée (transfection avec faible concentration uniquement, et perte de deux souris). Des études avec des concentrations plus faibles ou de multiples injections pourraient être envisagées dans le futur, en utilisant des formulations obtenues par extrusion. Un travail visant à diminuer encore les diamètres des polyplexes doit être entrepris sur ces vecteurs, de façon à obtenir des polyplexes de taille proche de 80 nm, taille dans la gamme idéale comme l'a démontré Dong et coll. (75 ou 87 nm).²¹ Pour les essais réalisés avec les nouvelles architectures et fonctionnalisations des PEI développées au laboratoire, ce

choix des PEI en étoile ou l'ajout d'un bloc hydrophile tel que PiPrOx à la /PEI est concluant puisque le traitement est toléré par les souris tout en permettant une transfection. Les masses molaires de 16 kDa pour les PEI en étoile et de 15 et 10 kDa pour les copolymères présentent des résultats prometteurs. En ce qui concerne les fonctionnalisations susceptibles d'améliorer le transfert de gènes (histidine pour l'échappement de l'endosome, galactose pour le ciblage cellulaire), il est nécessaire de travailler sur la solubilité de ces polymères fonctionnalisés et sur la formulation de polyplexes stables permettant une condensation forte de l'ADN*p*. Ces études permettront peut-être la formulation de complexes plus efficaces lors des tests biologiques.

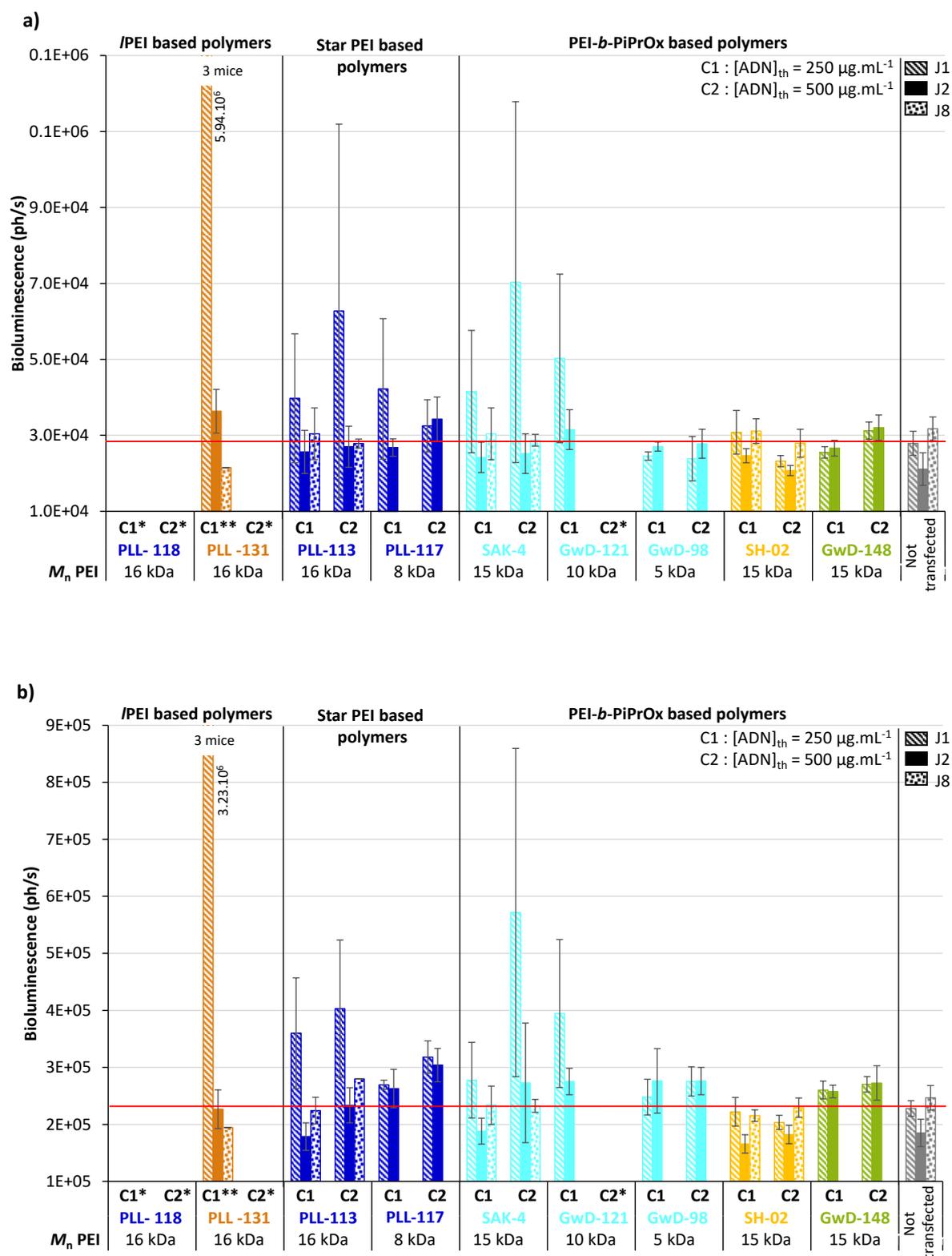


Figure IV.24 : Bioluminescence de (a) la face antérieure et (b) la face postérieure des souris ayant reçu des polyplexes formulés par extrusion. (200 µL injectés, [ADN] = 280 µg.mL⁻¹ et 550 µg.mL⁻¹) (* : 5 souris décédées, ** : 2 souris décédées).

Conclusion

Dans ce chapitre, une nouvelle technique de formulation a, tout d'abord, été mise au point avec succès. La formation de complexes par extrusion ouvre la voie à la synthèse de polyplexes de plus petite taille et à une concentration plus élevée que lors de formulations classiques. Les paramètres permettant une amélioration de la taille des complexes ont été optimisés ; à savoir, une pression de 1 bar, un diamètre de pore de 30 nm ainsi qu'un pH de 4,5 pour la solution de polymère. Ces paramètres ont pour but d'améliorer les cinétiques de complexation mises en jeu lorsque l'ADN p sort du pore et rencontre les chaînes polymères.

L'objectif était de formuler des complexes inférieurs à 100 nm. Cet objectif a été atteint avec succès lors de l'utilisation de IPEI de 5 à 25 kDa avec des résultats optimum obtenus pour la IPEI de 10 kDa à 0,05 mg.mL⁻¹ (70 nm). Néanmoins, l'utilisation de polymères de différentes structures (étoile ou copolymère) ou fonctionnalisés par l'histidine ou le galactose conduit à une augmentation de la taille des complexes. Les résultats prometteurs obtenus avec les IPEI nous ont amené à la formulation de complexes concentrés en ADN p . A haute concentration en ADN p , des tailles comprises entre 73 et 350 nm ont été obtenues. Bien que l'objectif de complexes inférieurs à 100 nm n'ait pas été atteint pour tous les complexes, des solutions de complexes d'une concentration en ADN p comparable à celle des virus sont obtenues de façon stable pour la première fois. Cela est une avancée notable et importante dans le cadre de la thérapie génique non virale.

Dans le but de discriminer ces formulations, des tests biologiques ont été effectués *in vitro* et *in vivo* afin d'évaluer les capacités de transfection et la cytotoxicité des nouvelles architectures synthétisées au cours de ce projet. Ces analyses biologiques ont permis de mettre en évidence différents points importants pour une thérapie génique sûre et efficace.

Tout d'abord, la IPEI et la IPEI(his) sont très efficaces pour des thérapies géniques *in vitro*. Cependant, ces polymères montrent leurs limites *in vivo*. En effet, lors de la formulation de solutions à une concentration en ADN p similaire aux thérapies virales, les traitements ne sont pas supportés par les souris malgré la très bonne efficacité de transfection observée avec la IPEI(his) pour 3 souris. La fonctionnalisation de ces polymères menée tout au long de ce travail de thèse est donc primordiale.

La POxylation des complexes a permis de diminuer la cytotoxicité des complexes tout en permettant une transfection similaire aux IPEI témoins *in vitro*. *In vivo*, l'ajout de ce bloc hydrophile est même nécessaire à la tolérance du traitement par les animaux. Les copolymères

PEI-*b*-PiPrOx comprenant un bloc PEI de 10 ou 15 kDa et un bloc PiPrOx de 5,7 kDa sont les copolymères ayant permis les meilleurs résultats lors des tests *in vivo* et sont donc prometteurs pour la suite de cette étude.

La structure en étoile a également permis une transfection sûre (pas de décès) et une transfection efficace dans le cas d'une masse molaire en PEI de 16 kDa.

Enfin, les fonctionnalisations des copolymères par l'histidine et par le galactose n'ont pas montré les résultats escomptés. Dans le cas de l'histidine, des tests supplémentaires doivent être réalisés à des WR_{PEI} plus élevés. La complexation efficace de l'ADN ρ devrait permettre un impact positif sur la transfection. Pour le galactose, la synthèse du polymère doit être modifiée afin de permettre l'obtention de polymères sans espaceur hydrophobe. De futurs tests permettront ensuite de conclure sur l'apport de cette fonctionnalisation. Des efforts importants sur ce point seront nécessaires afin de permettre un ciblage cellulaire actif palliant la furtivité induite par le bloc PiPrOx.

Pour conclure, les expériences ont permis d'avancer la réflexion scientifique. Dans le but de mimer l'architecture et l'efficacité des virus, les complexes devront être formulés par extrusion avec les paramètres mis au point. La fonctionnalisation des I_{PEI} est nécessaire à une thérapie génique sûre. Notamment, les PEI en étoile et la POxylation des complexes permettent l'injection non virale de grande quantité d'ADN ρ sous forme de complexes de petites tailles non toxiques. Ces complexes pourront encore être améliorés avec un travail sur la fonctionnalisation permettant l'échappement de l'endosome et un ciblage cellulaire.

Références

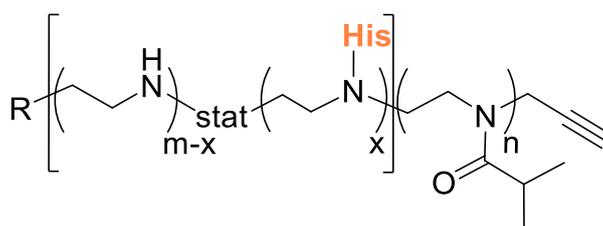
- (1) Kafil, V.; Omid, Y. Cytotoxic Impacts of Linear and Branched Polyethylenimine Nanostructures in A431 Cells. *Bioimpacts* **2011**, *1* (1), 23–30. <https://doi.org/10.5681/bi.2011.004>.
- (2) Okon, E. U.; Hammed, G.; Wafa, P. A. E.; Abraham, O.; Case, N.; Henry, E. In-Vitro Cytotoxicity of Polyethyleneimine on HeLa and Vero Cells. *IJJAS* **2014**, *5* (3), 192–199.
- (3) Jiang, C.; Chen, J.; Li, Z.; Wang, Z.; Zhang, W.; Liu, J. Recent Advances in the Development of Polyethylenimine-Based Gene Vectors for Safe and Efficient Gene Delivery. *Expert Opin. Drug Del* **2019**, *16* (4), 363–376. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1604681>.
- (4) Jäger, M.; Schubert, S.; Ochrimenko, S.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Branched and Linear Poly(Ethylene Imine)-Based Conjugates: Synthetic Modification, Characterization, and Application. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (13), 4755–4767. <https://doi.org/10.1039/C2CS35146C>.
- (5) Abbina, S.; Parambath, A. 14 - PEGylation and Its Alternatives: A Summary. In *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems*; Parambath, A., Ed.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, 2018; pp 363–376. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101750-0.00014-3>.
- (6) Bludau, H.; Czapar, A. E.; Pitek, A. S.; Shukla, S.; Jordan, R.; Steinmetz, N. F. POxylation as an Alternative Stealth Coating for Biomedical Applications. *Eur. Polym. J* **2017**, *88*, 679–688. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.10.041>.
- (7) Bauer, M.; Lautenschlaeger, C.; Kempe, K.; Tauhardt, L.; Schubert, U. S.; Fischer, D. Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) as Alternative for the Stealth Polymer Poly(Ethylene Glycol): Comparison of in Vitro Cytotoxicity and Hemocompatibility. *Macromol Biosci* **2012**, *12* (7), 986–998. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200017>.
- (8) Samulski, R. J.; Muzyczka, N. AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu. Rev. Virol.* **2014**, *1* (1), 427–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085355>.
- (9) Mengarelli, V.; Auvray, L.; Pastré, D.; Zeghal, M. Charge Inversion, Condensation and Decondensation of DNA and Polystyrene Sulfonate by Polyethylenimine. *Eur. Phys. J. E* **2011**, *34* (11), 127. <https://doi.org/10.1140/epje/i2011-11127-3>.
- (10) Pigeon, L.; Gonçalves, C.; Pichon, C.; Midoux, P. Evidence for Plasmid DNA Exchange after Polyplex Mixing. *Soft Matter* **2016**, *12* (33), 7012–7019. <https://doi.org/10.1039/C6SM00575F>.
- (11) 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.* **1995**, *92* (16), 7297–7301. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>.
- (12) Sellés, J.; Penrad-Mobayed, M.; Guillaume, C.; Fuger, A.; Auvray, L.; Faklaris, O.; Montel, F. Nuclear Pore Complex Plasticity during Developmental Process as Revealed by Super-Resolution Microscopy. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 14732. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15433-2>.
- (13) Auger, T.; Mathé, J.; Viasnoff, V.; Charron, G.; Di Meglio, J.-M.; Auvray, L.; Montel, F. Zero-Mode Waveguide Detection of Flow-Driven DNA Translocation through Nanopores. *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *113* (2), 028302. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.113.028302>.
- (14) Plet, L. Synthèse de nouveaux vecteurs cationiques à architecture en étoile pour le transfert de gènes <http://www.theses.fr/s243201> (accessed Jul 29, 2020).

- (15) Kulkarni, A. D.; Vanjari, Y. H.; Sancheti, K. H.; Patel, H. M.; Belgamwar, V. S.; Surana, S. J.; Pardeshi, C. V. Polyelectrolyte Complexes: Mechanisms, Critical Experimental Aspects, and Applications. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2016**, *44* (7), 1615–1625. <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1129624>.
- (16) Rinkenauer, A. C.; Vollrath, A.; Schallon, A.; Tauhardt, L.; Kempe, K.; Schubert, S.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Parallel High-Throughput Screening of Polymer Vectors for Nonviral Gene Delivery: Evaluation of Structure–Property Relationships of Transfection. *ACS Comb. Sci.* **2013**, *15* (9), 475–482. <https://doi.org/10.1021/co400025u>.
- (17) Abdallah, B.; Hassan, A.; Benoist, C.; Goula, D.; Behr, J. P.; Demeneix, B. A. A Powerful Nonviral Vector for In Vivo Gene Transfer into the Adult Mammalian Brain: Polyethylenimine. *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7* (16), 1947–1954. <https://doi.org/10.1089/hum.1996.7.16-1947>.
- (18) Zhang, X.; Pan, S.-R.; Hu, H.-M.; Wu, G.-F.; Feng, M.; Zhang, W.; Luo, X. Poly(Ethylene Glycol)-Block-Polyethylenimine Copolymers as Carriers for Gene Delivery: Effects of PEG Molecular Weight and PEGylation Degree. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *84A* (3), 795–804. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31343>.
- (19) Bertrand, E.; Gonçalves, C.; Billiet, L.; Gomez, J. P.; Pichon, C.; Cheradame, H.; Midoux, P.; Guégan, P. Histidinylated Linear PEI: A New Efficient Non-Toxic Polymer for Gene Transfer. *Chem. Commun. (Camb.)* **2011**, *47* (46), 12547–12549. <https://doi.org/10.1039/c1cc15716g>.
- (20) Maury, B.; Gonçalves, C.; Tresset, G.; Zeghal, M.; Cheradame, H.; Guégan, P.; Pichon, C.; Midoux, P. Influence of PDNA Availability on Transfection Efficiency of Polyplexes in Non-Proliferative Cells. *Biomaterials* **2014**, *35* (22), 5977–5985. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.007>.
- (21) Xu, D.-M.; Yao, S.-D.; Liu, Y.-B.; Sheng, K.-L.; Hong, J.; Gong, P.-J.; Dong, L. Size-Dependent Properties of M-PEIs Nanogels for Gene Delivery in Cancer Cells. *Int. J. Pharm.* **2007**, *338* (1), 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.01.050>.
- (22) Müller, M.; Keßler, B.; Fröhlich, J.; Poeschla, S.; Torger, B. Polyelectrolyte Complex Nanoparticles of Poly(Ethyleneimine) and Poly(Acrylic Acid): Preparation and Applications. *Polymers* **2011**, *3* (4), 762–778. <https://doi.org/10.3390/polym3020762>.
- (23) Kolate, A.; Baradia, D.; Patil, S.; Vhora, I.; Kore, G.; Misra, A. PEG — A Versatile Conjugating Ligand for Drugs and Drug Delivery Systems. *J. Control. Release* **2014**, *192*, 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.046>.
- (24) Brissault, B.; Kichler, A.; Guis, C.; Leborgne, C.; Danos, O.; Cheradame, H. Synthesis of Linear Polyethylenimine Derivatives for DNA Transfection. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14* (3), 581–587. <https://doi.org/10.1021/bc0200529>.
- (25) Owens, D. E.; Peppas, N. A. Opsonization, Biodistribution, and Pharmacokinetics of Polymeric Nanoparticles. *Int J Pharm* **2006**, *307* (1), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>.
- (26) Plank, C.; Mechtler, K.; Szoka, F. C.; Wagner, E. Activation of the Complement System by Synthetic DNA Complexes: A Potential Barrier for Intravenous Gene Delivery. *Hum Gene Ther* **1996**, *7* (12), 1437–1446. <https://doi.org/10.1089/hum.1996.7.12-1437>.
- (27) Verbaan, F. J.; Oussoren, C.; Snel, C. J.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E.; Storm, G. Steric Stabilization of Poly(2-(Dimethylamino)Ethyl Methacrylate)-Based Polyplexes Mediates Prolonged Circulation and Tumor Targeting in Mice. *J. Gene Med.* **2004**, *6* (1), 64–75. <https://doi.org/10.1002/jgm.475>.
- (28) DeRouchey, J.; Netz, R. R.; Rädler, J. O. Structural Investigations of DNA-Polycation Complexes. *Eur. Phys. J. E* **2005**, *16* (1), 17–28. <https://doi.org/10.1140/epje/e2005-00003-4>.

- (29) luciferase assay <https://www.tebu-bio.com/blog/tag/luciferase-assay/> (accessed Aug 21, 2020).
- (30) Aravindan, L.; Bicknell, K. A.; Brooks, G.; Khutoryanskiy, V. V.; Williams, A. C. Effect of Acyl Chain Length on Transfection Efficiency and Toxicity of Polyethylenimine. *Int. J. Pharm.* **2009**, *378* (1), 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.052>.
- (31) Al-Dosari, M. S.; Gao, X. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *AAPS J* **2009**, *11* (4), 671. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9143-y>.
- (32) Ramamoorth, M.; Narvekar, A. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *J Clin Diagn Res* **2015**, *9* (1), GE01–GE06. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10443.5394>.
- (33) Muhammad, K.; Zhao, J.; Ullah, I.; Guo, J.; Ren, X.; Feng, Y. Ligand Targeting and Peptide Functionalized Polymers as Non-Viral Carriers for Gene Therapy. *Biomater. Sci.* **2020**, *8* (1), 64–83. <https://doi.org/10.1039/C9BM01112A>.
- (34) Yue, Y.; Pan, X.; Hakim, C. H.; Kodippili, K.; Zhang, K.; Shin, J.-H.; Yang, H. T.; McDonald, T.; Duan, D. Safe and Bodywide Muscle Transduction in Young Adult Duchenne Muscular Dystrophy Dogs with Adeno-Associated Virus. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24* (20), 5880–5890. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv310>.
- (35) Bertrand, N.; Leroux, J.-C. The Journey of a Drug-Carrier in the Body: An Anatomico-Physiological Perspective. *J Control Release* **2012**, *161* (2), 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.098>.
- (36) Yasugi, K.; Nagasaki, Y.; Kato, M.; Kataoka, K. Preparation and Characterization of Polymer Micelles from Poly(Ethylene Glycol)-Poly(d,l-Lactide) Block Copolymers as Potential Drug Carrier. *J Control Release* **1999**, *62* (1), 89–100. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00028-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00028-0).
- (37) Ito, T.; Iida-Tanaka, N.; Koyama, Y. Efficient *in Vivo* Gene Transfection by Stable DNA/PEI Complexes Coated by Hyaluronic Acid. *J Drug Target* **2008**, *16* (4), 276–281. <https://doi.org/10.1080/10611860801900728>.

Annexes

Annexe IV.1 : Définition des différents paramètres présents dans les tableaux.



M_n polymer représente la masse molaire totale du polymère en prenant en compte toutes les fonctionnalisations d'après l'équation suivante :

$$M_n \text{ polymer} = M_n \text{ PEI,th} + \frac{M_n \text{ PEI,th}}{M_{EI}} \times \%HNA \times M_{HNA} + M_n \text{ PiPrOx,th}$$

%PEI représente la fraction massique en la quantité de PEI contenue dans le polymère et est calculé d'après l'équation suivante :

$$\%PEI = \frac{M_n \text{ PEI,th}}{M_n \text{ polymer}}$$

Dans cette formule, seul le squelette PEI est pris en compte, i.e le poids apporté par les résidus histidine a été retiré au poids total des motifs EI (modifiés et non modifiés).

WR_{polymer} représente le rapport entre la masse de polymère et la masse d'ADN lors de la formulation d'après l'équation suivante :

$$WR_{\text{polymer}} = \frac{\text{mass polymer}}{\text{mass DNA}} = \frac{[\text{polymer}] \times V_{\text{polymer}}}{[\text{DNA}] \times V_{\text{DNA}}}$$

WR_{PEI} représente le rapport entre la masse de PEI et la masse d'ADN lors de la formulation d'après l'équation suivante :

$$WR_{\text{PEI}} = \frac{\text{mass polymer}}{\text{mass DNA}} \times \%PEI = WR_{\text{polymer}} \times \%PEI$$

N/P représente le rapport entre le nombre total de motifs EI (fonctionnalisés et non fonctionnalisés par la HNA) et le nombre de base de l'ADN lors de la formulation d'après l'équation suivante :

$$\frac{N}{P} = \frac{\text{mol}_{EI}}{\text{mol}_{\text{Phosphate base}}} = \frac{\frac{\text{mass}_{\text{polymer}}}{M_n \text{ Polymer}} \times X_n \text{ EI}}{\frac{\text{mass}_{\text{DNA}}}{M_n \text{ DNA}} \times X_n \text{ DNA}} = \frac{\frac{[\text{polymer}] \times V_{\text{polymer}}}{M_n \text{ Polymer}} \times \frac{M_n \text{ PEI}}{M_{EI}}}{\frac{[\text{DNA}] \times V_{\text{DNA}}}{M_n \text{ DNA}} \times \frac{M_n \text{ DNA}}{M_{\text{nucleotide}}}}$$

Annexe IV.2 : Formulation classique des polyplexes pour les tests *in vitro*.

Dans le cas de *l*PEI, les formulations aux différents WR_{PEI} sont réalisés suivant le **Tableau IV.15**.

Tableau IV.15 : Paramètres de formulation des polyplexes par voie classique pour les tests *in vitro* aux divers WR_{PEI} dans le cas d'une *l*PEI non fonctionnalisée.

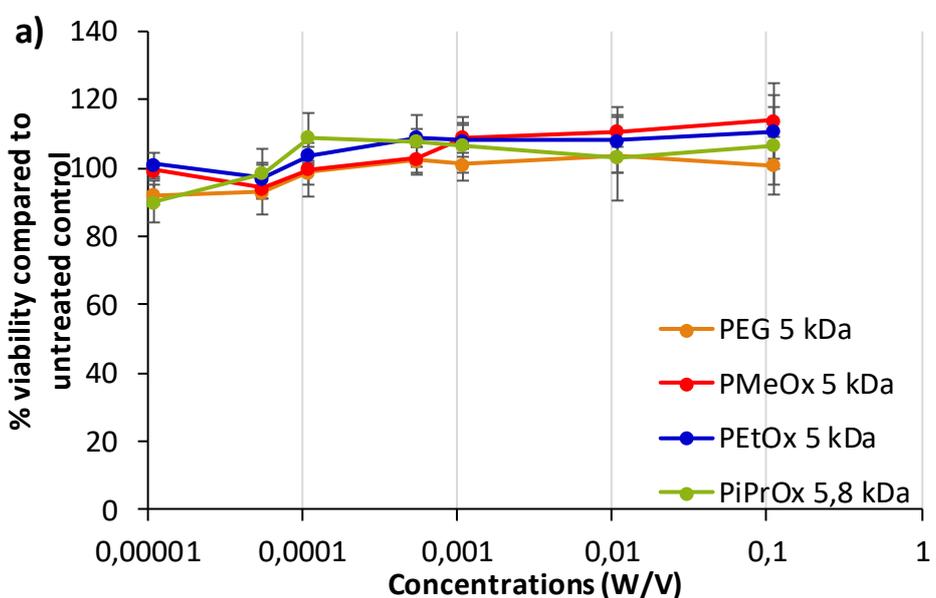
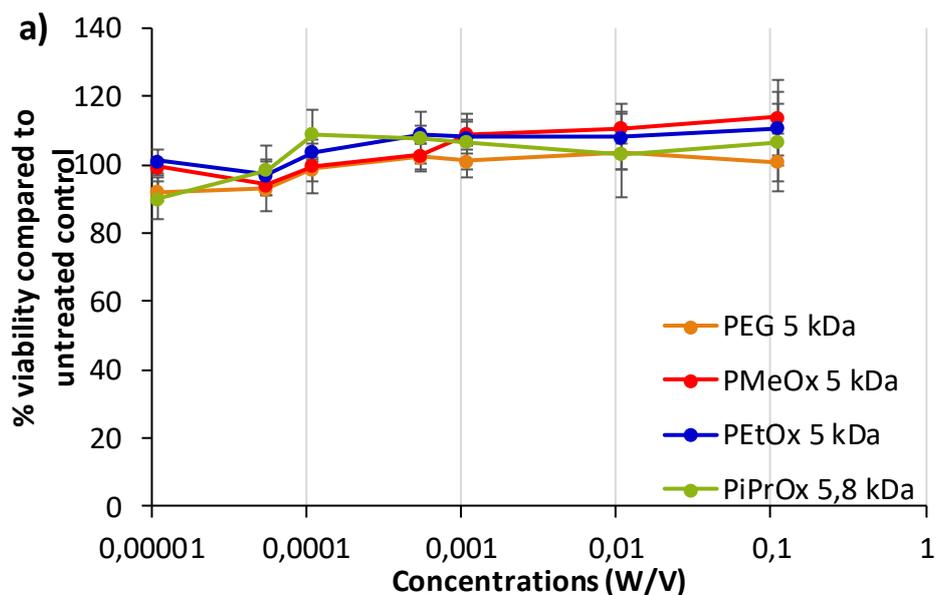
WR_{PEI}	DNA solution		Polymer solution		Total Volume (μL)
	V_{DNA} (1 mg.mL ⁻¹) (μL)	V_{Hepes} (μL)	$V_{polymer}$ (1 mg.mL ⁻¹) (μL)	V_{Hepes} (μL)	
1/1	10	10	40	10	40
3/1	10	50	120	30	120
5/1	10	90	200	50	200
6/1	10	110	240	60	240
8/1	10	150	320	80	320

Si des polymères de type *l*PEI(his), PEI-*b*-PiPrOx, PEI(his)-*b*-PiPrOx ou PEI-*b*-PiPrOx-Gal sont utilisés, les formulations sont réalisées selon le **Tableau IV.16**.

Tableau IV.16 : Paramètres de formulation des polyplexes par voie classique pour les tests *in vitro* aux divers WR_{PEI} dans le cas d'une PEI fonctionnalisée.

WR_{PEI}	DNA solution		Polymer solution		Total Volume (μL)
	V_{DNA} (1 mg.mL ⁻¹) (μL)	V_{Hepes} (μL)	$V_{polymer\ functionalized}$ (1 mg.mL ⁻¹) (μL)	V_{Hepes} (μL)	
1/1	10	10	40 / % PEI	$10 - (V_{polymer\ functionalized} - 40)$	40
3/1	10	50	120 / % PEI	$30 - (V_{polymer\ functionalized} - 120)$	120
5/1	10	90	200 / % PEI	$50 - (V_{polymer\ functionalized} - 200)$	200
6/1	10	110	240 / % PEI	$60 - (V_{polymer\ functionalized} - 240)$	240
8/1	10	150	320 / % PEI	$80 - (V_{polymer\ functionalized} - 320)$	320

Par exemple, dans le cas d'une formulation au WR 1/1 avec un polymère contenant 60 % massique de PEI, le volume de solution de polymère à 1 mg.mL⁻¹ à prélever sera de 16 μL ($10 / 60 * 100 = 16 \mu\text{L}$) et le volume d'Hepes à ajouter sera de 4 μL ($10 - (16 - 10) = 10 - 6 = 4 \mu\text{L}$).



Annexe IV.3 : Tests de cytotoxicité des homopolymères polyoxazoline sur des cellules (a) HeLa et (b) A549.

Les homopolymères poly(2-alkyl-2-oxazoline) synthétisés au laboratoire ont été testés sur deux types de cellules (HeLa et A549) afin de connaître la toxicité qu'ils induisent. Les deux graphiques présents ci-dessus démontrent que les polymères PMeOx, PEtOx et PiPrOx de 5 kDa n'induisent aucune toxicité au même titre que le PEG utilisé comme référence ici (100 % de viabilité cellulaire quelle que soit la concentration en polymère). Ces poly(2-oxazoline)s peuvent ainsi être utilisées en transfert de gènes couplées à de la PEI afin de diminuer sa toxicité et permettre également une furtivité des complexes.

(Collaboration avec l'équipe de Pr. Tristan Montier – UBO – Brest)

CHAPITRE 5

Techniques expérimentales

Table of contents

Part I. Instrumentation	303
I. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	303
II. Size Exclusion Chromatography (SEC)	304
II.1. SEC in DMF	304
II.2. SEC in water	304
III. Dynamic Light Scattering (DLS)	304
IV. Mass spectrometry	305
IV.1. Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF)	305
IV.2. High Resolution Mass Spectrometry (HRMS-ESI)	305
V. Nano DSC differential scanning calorimeter	306
VI. Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM)	306
Part II. Synthetic procedures	306
I. Reagents	306
II. Dialysis	307
III. Poly(2-oxazoline)s synthesis	308
III.1. Homopoly(2-oxazoline)s	308
III.2. PMeOx- <i>b</i> -PEtOx copolymers	308
III.3. PiPrOx- <i>b</i> -PMeOx copolymers	309
IV. Poly(ethylenimine) synthesis	310
IV.1. Homopolymers of poly(ethylenimine)	310
IV.1.a. Basic hydrolysis	310
IV.1.b. Acidic hydrolysis	310
IV.2. POx- <i>b</i> -PEI copolymers	310
IV.2.a. Basic hydrolysis	310
IV.2.b. Acidic hydrolysis	311
V. Polymers post-functionalization	311
V.1. Histidine grafting	311
V.1.a. Synthesis of HNA	311
V.1.b. HNA grafting onto polymers	312
V.2. Galactose grafting	313
V.2.a. Synthesis of the 3-mercaptopropyl- β -D-galactopyranoside	313
V.2.b. Galactose grafting onto polymers	315
Part III. Biological protocol	316
I. Materials	316
I.1. Plasmids	316
I.2. Reagent and buffer	316
I.3. Cells	316
II. Polyplexes formulation	316

Chapter 5

II.1. Standard method	316
II.2. Extrusion method.....	316
III. Size and zeta potential evaluation of polyplexes	317
IV. Electrophoretic mobility shift assays	318
V. Transfection efficiency of polyplexes	318
VI. Cytotoxicity of polymers.....	318
VII. <i>In vivo</i> experiment.....	319
References	320

Part I. Instrumentation

I. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

The Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM) uses different NMR spectrometers from the NMR platform of the FR2769 federation. 300 MHz Bruker Nanobay spectrometers and 400 MHz Bruker Nanobay spectrometer are available in self-service. Our ^1H NMR analyses are performed on these spectrometers. For others analyses with longer time of experiment (^{13}C NMR, 2D experiments: $^1\text{H}/^1\text{H}$ (COSY) and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQCed) or DOSY experiment), two spectrometers (400 MHz Bruker Avance I and 600 MHz Bruker Avance III) are available with booking. These five spectrometers are equipped with autosamplers. The exploitation software used was TopSpin.

The solutions for NMR analyses were prepared at 30 mg.mL^{-1} for ^1H NMR analysis and at $80\text{-}100 \text{ mg.mL}^{-1}$ for ^{13}C NMR analysis with deuterated solvents from Euriso-TOP. ^1H , ^{13}C , HSQC and COSY analyses were processed at $20 \text{ }^\circ\text{C}$. The diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) experiments were carried out at 298 K using the ledbpgp2s.mod pulse sequence with a linear gradient of 16 steps between 5 and 95 %. The maximum field gradient strength was equal to 5.54 G.mm^{-1} . Before each diffusion experiment, the length of the gradient δ and the diffusion time Δ were optimized. The software used for data analysis was also TopSpin. The used mathematical treatment of the data was described in an article from the team.¹

Spectra were processed on MestReNova software for 1D analyses. For 2D analyses, TopSpin software was used to phase the spectra before thr process on MestReNova. The chemical shifts were expressed in parts per million (ppm) and the spectrum calibration was performed with the solvent signal. **Table V.1** gives the chemical shift for the solvents used.

Table V.1 : Chemical shifts of used deuterated solvents.

	^1H		^{13}C	
	Multiplicity	δ (ppm)	Multiplicity	δ (ppm)
Chloroform (CDCl_3)	singlet	7.26	triplet	77.16
Water (D_2O)	singlet	4.79	-	-
Methanol (Methanol- D_4)	quintuplet	3.31	septuplet	49.00

II. Size Exclusion Chromatography (SEC)

II.1. SEC in DMF

Size Exclusion Chromatography (SEC) in DMF was performed with a system equipped with two columns PSS GRAM 1000 Å (8×300 mm; separation limits: 1 to 1000 kg.mol⁻¹) and one PSS GRAM 30 Å (8×300 mm; separation limits: 0.1 to 10 kg.mol⁻¹) coupled to a differential refractive index (RI) detector and a UV detector at 60 °C. The eluent used was DMF containing 1 g.L⁻¹ of LiBr at a flow rate of 0.8 mL.min⁻¹. Samples were filtered over 0.22 µm PTFE filters before analysis. The number-average molar mass (M_n), the weight-average molar mass (M_w), and the dispersity \mathcal{D} ($\mathcal{D} = M_w/M_n$) of the polymers were calculated using PMMA standards.

II.2. SEC in water

The SEC analyses in water were performed at 35 °C with a 0.2 M NaNO₃ aqueous solution and a flow rate of 0.7 mL.min⁻¹ using a Viscotek SEC system (Viscotek VE 2001 GPC Solvent GPC MAX Sample Module and TDA 302 triple detector array) equipped with two SHODEX OH pack columns SB-806 M HQ (13 µm, 300 × 8 mm). Polymers were injected at a concentration of 4 mg.mL⁻¹ after filtration through a 0.2 µm pore size membrane. The absolute molar masses were determined by the three in-line detectors (refractometer, viscometer, and light scattering) relying upon a calibration based on poly(ethylene oxide) standards.

III. Dynamic Light Scattering (DLS)

DLS analyses were performed in two different apparatus.

The first one, located at IPCM, is a Nano S90 (Malvern). Analyses were performed at different temperatures with a 5 mW He–Ne laser at 633 nm. The scattered light intensity was measured at an angle of 90 °. Averages diameters in number and intensity will be discussed.

The second one, used in Orléans, is a SZ-100 Nanopartica (Horiba). Analyses were performed at 25 °C with a 10 mW DPSS laser at 532 nm. The scattered light intensity was measured at an angle of 90 ° for size analyses and 13 ° for zeta potential analyses.

IV. Mass spectrometry

IV.1. Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF)

Mass spectra were recorded by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) using a Bruker autoflex III smartbeam mass spectrometer, equipped with a laser that produces pulses at 337 nm using: **(a)** 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB) as a matrix without cationizing agent for poly(2-methyl-2-oxazoline), **(b)** 2,5-dihydroxybenzoic acid as a matrix and NaI as a cationizing agent for poly(2-ethyl-2-oxazoline) or **(c)** α -cyanohydroxycinnamic acid (CHCA) as a matrix and NaI as a cationizing agent for poly(2-isopropyl-2-oxazoline). Spectra were recorded in reflectron and linear mode at an accelerating potential of 20 kV.

Samples were prepared by dissolving the polymer in ACN/H₂O 1/1 v/v for matrix **(a)**, in ACN/H₂O 1/1 v/v for matrix and salt **(b)** or in ACN for matrix and salt **(c)** at a concentration of 5 mg.mL⁻¹. A 10 μ l aliquot of this solution was mixed with 20 μ l of matrix solution (at 20 mg.mL⁻¹ in ACN/H₂O 1/1 v/v for 2,5-DHB matrix or MeOH for CHNA matrix) and 10 μ l of salt solution if required (at 20 mg.ml⁻¹ in ACN). A poly(ethylene oxide) standard of known structure, $M_n = 1470$ g.mol⁻¹, purchased from Polymer Standards Service) was used to calibrate the mass scale.

IV.2. High Resolution Mass Spectrometry (HRMS-ESI)

High resolution mass spectrometry analyses were done with ESI-LQT-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) in negative ionization mode with a capillary tension of 3.2 kV. Applied tensions were 20 and 70 V, respectively for the ions transfer capillary and tube lens. The transfer capillary was maintained at 275 °C. The detection was realized in the Orbitrap with a resolution fixed at m/z 100000 (at m/z 400) and a m/z range between 200 and 400 in profile mode. Spectra were analyzed with XCalibur 2.1 software (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). The automatic gain control (AGC) was adjusted at 300 ms with 1 μ scan. 10 μ L at 0,01 mg.mL⁻¹ in ACN were injected with a HPLC Thermo Finnigan Surveyor System (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) with a continue infusion of methanol at 100 μ L.min⁻¹.

V. Nano DSC differential scanning calorimeter

Nano DSC thermograms were recorded on a N-DSCIII instrument from TA Instruments. The reference cell was filled with water (0.3 mL) and the sample cell (0.3 mL) with aqueous solution of polymer ([Ox units] = 0.48 M). The capillary cells were not capped, and a constant pressure of 5×10^5 Pa was applied. Four cycles of heating and cooling ($1 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) were performed. A baseline scan (solvent in both reference and sample cells) was systematically conducted in identical conditions and subtracted from the sample scan (the first run was used to perform the calculation).

VI. Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM)

Polyplexes were analyzed by Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM). 3 μL of sample solution were placed on a perforated carbon grid (Quantifoil R2/2), previously ionized by glow discharge. The excess solution was absorbed with filter paper and then the grid was immersed directly in liquid ethane cooled with liquid nitrogen with a FEI Vitrobot cryoplunger. The grids were stored in liquid nitrogen until use. The frozen samples were introduced into a high resolution JEOL-2010 transmission electron microscope equipped with a 200 kV field emission gun via a Gatan 626 cryoholder. Samples were imaged at 50 000 magnification using a minimal dose system enabling film exposure while preserving samples from beam damage. Images were collected with a Gatan Ultrascan 4K CCD camera with a 1.5 and 2 μm defocus.

Part II. Synthetic procedures

I. Reagents

Used reagents are listed in **Table V.2**. Acetonitrile (CH_3CN , VWR), allyl bromide, 2-ethyl-2-oxazoline, 2-methyl-2-oxazoline and 2-isopropyl-2-oxazoline were dried over calcium hydride. These reagents were cryodistilled before used

Morpholine and piperidine were dried over molecular sieves (3 \AA) activated by heating at $150 \text{ }^\circ\text{C}$ overnight under vacuum prior to use. Propargyl *p*-toluenesulfonate was dried over CaCO_3 and filtered with 0.2 μm PTFE filters in the glove box before used. Dansyl chloride was dried under vacuum prior to use.

3-mercaptoethylgalactose was synthesized by Dr. Vincent Corcé from IPCM – Chembio Team and stored under N₂ atmosphere.

HCl (37 %), 1-butanol (> 99 %), 1-propanol (99.9 %), and 1,2-propanediol (99 %) were purchased from Aldrich. Dichloromethane and absolute ethanol were purchased from VWR chemicals. Deionized water was obtained using a Millipore Milli-Q system.

Table V.2: List of reagents used

Name	Purity (%)	Supplier	Molar mass (g.mol ⁻¹)	Density at 25 °C (g.mL ⁻¹)
1-(2-propynyl)piperazine	97	TCI	124.2	-
2-éthyl-2-oxazoline	≥ 99	Sigma-Aldrich	99.13	0.982
2-isopropyl-2-oxazoline	97	TCI	113.13	0.950
2-méthyl-2-oxazoline	98	Sigma-Aldrich	85.10	1.005
Allyl bromide	99	Sigma-Aldrich	120.98	1.398
Acryloyl chloride	96	Alfa Aesar	90.51	1.114
Dansyl amide	99	Sigma-Aldrich	250.32	-
Dansyl chloride	97	ABCR	269.76	1.360
L-histidine	> 99	Sigma-Aldrich	155.15	-
Morpholine	99	ABCR	87.12	1.007
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine	99	Sigma-Aldrich	129.24	1.414
Piperidine	99	Acros Organics	85.15	0.862
Propargyl <i>p</i> -toluenesulfonate	97	Sigma-Aldrich	210.25	1.22
tert-butylhydroperoxyde in aqueous solution at 70 %	-	Sigma-Aldrich	90.12	0.940

II. Dialysis

Dialysis membrane purchased from Repligen. Spectra/Por® 6 Standard Regenerated Cellulose (RC) with a cut off of 1 kDa was used. Solvent used were water, ACN or alcohol and a minimum of three exchanges of the solvent were performed during a dialysis time of 24h.

III. Poly(2-oxazoline)s synthesis

III.1. Homopoly(2-oxazoline)s

Polymerization of MeOx, EtOx, iPrOx were conducted in acetonitrile at 80 °C in a 100 mL schlenk flask degassed under high vacuum and flamed out. Monomers, solvent and allyl bromide were dried before and over CaH₂ as follows: the round bottom flask with ramp connector containing CaH₂ and the reagent were freezing and put under high vacuum. 2 cycles of freeze/thaw at minimum were performed to obtain a vacuum of 8.10⁻⁶ to 4.10⁻⁵ mbar. After cryodistillation, products were stored in glove box until use (4 weeks at maximum). The following procedure of polymerization is detailed for GwD-133.

A 1.5 M solution of 2-methyl-2-oxazoline (2 mL, 2.36.10⁻² mol.L⁻¹, 235 eq) in acetonitrile (13.58 mL) with propargyl *p*-toluenesulfonate (17 μL, 1.0.10⁻⁴ mol, 1 eq) was stirred at 80 °C under N₂ atmosphere. After complete conversion of MeOx (4 days), the schlenk was cooled down to room temperature. An excess of morpholine (90 μL, 1.0.10⁻³ mol, 10 eq) was added to quench the reaction and stirred all night long. ¹H NMR spectroscopy analysis of the reaction medium was performed to ascertain MeOx conversion. Then, the solvent was evaporated and the polymer was dried in vacuum overnight at 50 °C and purified by two dialyses against CAN, for the first one, and water, for the second one. The polymer was recovered by freeze drying. The synthesized polymer was analysed by SEC and NMR spectroscopy in order to determine *M_n* and *Đ* and to confirm its structure.

Quantities and monomer/initiator ratios used for the other polymerizations were summarized in the respective tables in the manuscript.

III.2. PMeOx-*b*-PEtOx copolymers

Diblock copolymers POx were synthesized via cationic ring-opening polymerization of Ox in a two-step procedure by sequential monomer addition. The procedure for the synthesis of PMeOx-*b*-PEtOx, and in particular the used reagents quantities, are detailed for P₂ copolymer.

A 100 mL schlenk flask was degassed under high vacuum and flamed out. First, a 1.5 M solution of 2-methyl-2-oxazoline (6.2 mL, 7.32.10⁻² mol, 233.8 eq) in acetonitrile (42.6 mL) with allyl bromide (27 μL, 3.13.10⁻⁴ mol, 1 eq) was stirred at 80 °C under N₂ atmosphere. After complete conversion of MeOx (5 days), the schlenk was cooled down to room temperature. A

small sample (0.6 mL) was taken for SEC and ^1H NMR analyses to confirm the MeOx conversion. Then, 2-ethyl-2-oxazoline (0.96 mL, $9.48 \cdot 10^{-3}$ mol, 31 eq) was added in order to obtain a 0.197 M solution of 2-ethyl-2-oxazoline and the reactor was again stirred at 80 °C for 3 days. At the end of the polymerization, an excess of piperidine (0.31 mL, $3.13 \cdot 10^{-3}$ mol, 10 eq) was added to quench the reaction and stirred all night long. ^1H NMR spectroscopy analysis of the reaction medium was performed to ascertain EtOx conversion. Then, the solvent was evaporated and the polymer was dried in vacuum overnight at 50 °C and purified by dialysis against water. The polymer was recovered by freeze drying. The synthesized copolymer was analysed by SEC and ^1H NMR spectroscopy in order to determine M_n and D and its composition.

Quantities and monomer/initiator ratios used for the other polymerizations are summarized in the respective tables in the manuscript.

III.3. PiPrOx-*b*-PMeOx copolymers

The procedure for the synthesis of PiPrOx-*b*-PMeOx, and in particular the used reagents quantities, are detailed for P₅ copolymer.

A 100 mL schlenk flask was degassed under high vacuum and flamed out. First, a 1.5 M solution of 2-isopropyl-2-oxazoline (1.1 mL, $9.24 \cdot 10^{-3}$ mol, 50.5 eq) in acetonitrile (5.03 mL) with propargyl *p*-toluenesulfonate (32 μL , $1.83 \cdot 10^{-4}$ mol, 1 eq) was stirred at 80 °C under N₂ atmosphere. After complete conversion of iPrOx (2 days), the schlenk flask was cooled to room temperature. A small sample (0.6 mL) was taken for SEC and ^1H NMR analyses to confirm the iPrOx conversion. Then, 2-methyl-2-oxazoline (3.38 mL, $3.99 \cdot 10^{-2}$ mol, 235 eq) and acetonitrile (21.06 mL) were added to obtain a 1.5 M solution of 2-methyl-2-oxazoline and the reactor was again stirred at 80 °C for 3 days. At the end of the polymerization, an excess of piperidine (0.17 mL, $1.70 \cdot 10^{-3}$ mol, 10 eq) was added to quench the reaction, and the mixture was stirred overnight. ^1H NMR spectroscopy analysis of the reaction medium was performed to ascertain MeOx conversion. Then, the solvent was evaporated, and the polymer was dried in vacuum overnight at 50 °C and purified by two successive dialyses (the first one against ACN and the second one against water). The polymer was recovered by solvent evaporation after the first dialysis and freeze-dried after the second dialysis. The synthesized copolymer was analysed by SEC and ^1H NMR spectroscopy to determine M_n , D and its composition.

Quantities and monomer/initiator ratios for the other polymerizations are summarized in the respective tables in this manuscript.

IV. Poly(ethylenimine) synthesis

IV.1. Homopolymers of poly(ethylenimine)

IV.1.a. Basic hydrolysis

PMeOx and PEtOx homopolymers were dissolved in distilled water at 0.85 M amide concentration with 2.1 equivalents of NaOH per oxazoline unit and then heated at reflux. After two days of reaction, the reaction medium was neutralized by 12.5 M HCl addition to reach neutral pH (checked with pH paper). Then, the hydrolyzed polymer was purified by dialysis against water and recovered by freeze-drying. ^1H NMR spectroscopy in MeOD or D_2O was used to determine the hydrolysis rate. Conditions and results are summarized in respective tables in this manuscript.

IV.1.b. Acidic hydrolysis

PMeOx homopolymers were dissolved in distilled water at 0.48 M amide concentration with 9 equivalents of HCl per oxazoline unit and then heated at reflux. After 16.5 h of reaction, 12.5 M NaOH solution was added to neutralize the reaction medium and reach a neutral pH. After purification by dialysis against water, the hydrolyzed polymer was recovered by freeze-drying. ^1H NMR spectroscopy in D_2O was used to determine the hydrolysis rate. Conditions and results are summarized in respective tables in this manuscript.

IV.2. POx-*b*-PEI copolymers

IV.2.a. Basic hydrolysis

Copolymers were dissolved in distilled water at a 0.8 M amide concentration and then heated at reflux in a 100 mL round bottom flask equipped with a condenser. After 15 min of reflux, NaOH was added (2 eq/Ox unit for HP_{1-1} and HP_{1-2} and 1 eq/Ox unit for HP_{2-1}). Each hydrolysis was performed at reflux as a function of time (see different tables in this manuscript). Then, the hydrolyzed polymer was purified by dialysis against water and recovered by freeze-drying. No analysis was performed because of the polymer insolubility.

IV.2.b. Acidic hydrolysis

The different copolymers were hydrolyzed by adjusting a procedure reported by Hoogenboom et al.² Co-POx were dissolved in pure ethanol and heated at reflux in a 100 mL one-neck round bottom flask equipped with a condenser. After 15 min of reflux, 37% HCl was added to obtain ethanol/water 80/20 (v/v) solvent mixture in the reactor. The amide concentration was set at 0.48 M for each hydrolysis with a ratio of 6.6 eq of HCl/amide function. Each hydrolysis was performed at reflux for varying times according to the copolymer mo

lar mass. Then, the hydrolyzed polymer was purified by dialysis against water and recovered by freeze-drying. ¹H NMR spectroscopy was used to determine the hydrolysis ratio of each block. Conditions and results are summarized in respective tables in this manuscript.

For PiPrOx-*b*-PMeOx hydrolysis, each hydrolysis reaction was kinetically monitored. The results reported in the tables correspond to the optimized conditions.

Solubilization of hydrolyzed homo and copolymers (PEI and PEI-*b*-PiPrOx) in water needed, sometimes, to heat the solution (oil bath at 65 °C). If the polymer was not solubilized after 30 min at 65 °C, HCl 6 M was added to reach pH 2. After complete solubilization (translucid solution), 1 M NaOH was added slowly to obtain neutral pH. The pH was checked by pH paper.

V. Polymers post-functionalization

V.1. Histidine grafting

V.1.a. Synthesis of HNA

The procedure for the synthesis of L-histidine-*N*-acryloyl, and in particular the used reagents quantities, is detailed for ASV-3.

In a 50 mL three-neck round-bottom flask, 3.02 g de L-histidine (19.9 mmol, 1 eq) were solubilized in alkaline solution with 0.9 g of sodium hydroxide (22.5 mmol) in 10 mL of distilled water. Then, 1.61 mL of acryloyl chloride (20 mmol, 1 eq) and 1.61 mL of alkaline solution of sodium hydroxide (12.5 M) were added to the reaction medium. The simultaneous addition of these two solutions was monitored with a syringe driver during 6 h with a flow rate

of $0.005 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. During all the addition time, the reaction medium was stirred at $-5 \text{ }^\circ\text{C}$ (cryostat used). The pH needed to be maintained between 12 and 13 during the reaction.

Note: The reaction medium pH was checked with pH paper every 15 min. If the pH went down under 12, some drops of sodium hydroxide (12.5 M) were added with Pasteur pipette to reach a pH upper 12 (pH paper).

At the end of the addition, the solution was acidified with 9 mL of hydrochloride acid 6 M to reach a pH around 2. The mixture was precipitated in 400 mL of cold acetone (first precipitation). This precipitation allowed the elimination of salts (NaCl) and the L-histidine which did not react. The mixture was then filtered with sintered glass of porosity 3 to recover the filtrate. The solvent was evaporated at ambient temperature, then the reddish liquid was freeze dried during 16 h. After lyophilisation, a pink crystalline solid was obtained. The solid was, then, solubilized in a mixture of 3 mL of water distilled and 1 mL of HCl 6 M and precipitated in 50 mL of cold acetone (2nd precipitation). As previously, the mixture was filtered in a sintered glass of porosity 3, the solvent was evaporated. After the last lyophilisation, a white solid was obtained.

The characterization of the final product was done by ^1H NMR in deuterated water.

Notes:

- The product must not remain in solution
- The product must not be heated in solution
- The final product is sensitive to humidity and needs to be stored under inert atmosphere at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

V.1.b. HNA grafting onto polymers

The procedure for the synthesis of histidinylated homopolymers, and in particular the used reagents quantities, is detailed for GwD-156.

In a 50 mL three-neck round-bottom flask equipped with a condenser, 250.0 mg of PEI (GwD-138, $5.81\cdot 10^{-3}$ mol of EI units, 1 eq) were solubilized in 2.5 mL of distilled water and 2 mL of HCl 6 M were added to obtain a pH of 2 (checked with pH paper). The solution was totally clear. Some drops of NaOH 12.5 M were added to reach a pH of 7 (checked with pH paper). Then, a solution with 400 mg of L-histidine-*N*-acryloyl (GwD-129, $1.74\cdot 10^{-3}$ mol, 0.3 eq) in 2 mL of distilled water was added drop by drop in the reaction medium with a syringe driver. A flow rate of $0.08 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ was set (25 h of addition). The reaction medium was stirred

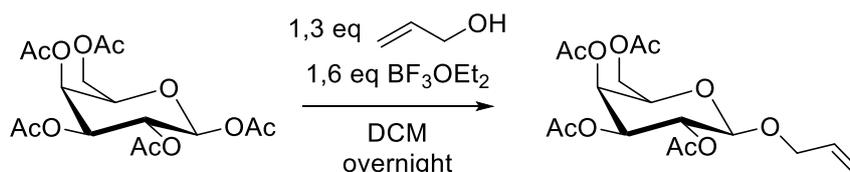
at reflux under inert atmosphere during 2 days from the start of the addition. Then, the solution was freeze dried during 16 h. The yellowish solid was solubilized in a minimum of water ($\approx 2/3$ mL) and precipitated in a cold mixture of ethanol (220 mL) / HCl 6 M (3,75 mL) ($T < -40$ °C with a liquid nitrogen bath and acetone because at ambient temperature, the product solubilizes). The filtration was done with a sintered glass of porosity 5 with gradual addition of the mixture to avoid warming. The precipitate was solubilized in 3 mL of distilled water and dialyzed against water. The product was recovered by freeze-drying. The dialysis allowed to remove unreacted HNA molecules, residual HCl and ethanol.

V.2. Galactose grafting

V.2.a. Synthesis of the 3-mercaptopropyl- β -D-galactopyranoside

The synthesis was performed by Dr Vincent Corcé (IPCM, Chembio Team)

Synthesis of allyl 2,3,4,6-Tetra-O-Acetyl- β -D-galactopyranoside

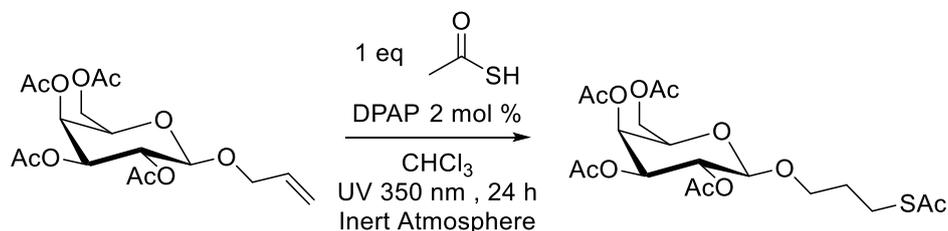


To a stirred solution of penta-O-acetyl- β -D-galactopyranoside (1 equiv., 15.3 mmol, 6 g) in anhydrous dichloromethane (60 mL) was added allyl alcohol (1.3 equiv., 19.6 mmol, 1.4 mL) under Ar atmosphere. The solution was cooled to 0 °C with an ice bath and BF_3OEt_2 (1.6 equiv., 25 mmol, 3 mL) was added dropwise. The ice bath was removed after the addition and the reaction mixture was stirred overnight. Water was added and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc and washed with aqueous 1 M HCl solution, sat. NaHCO_3 , H_2O and brine. The organic phase was dried over MgSO_4 and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 75/25 v/v) to afford the title compound (3.1 g, 52 %) as a colorless oil. The product is characterized by ^1H and ^{13}C NMR in CDCl_3 . Analytical data were in agreement with those reported in the literature.³

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 5.90 – 5.77 (1H, m), 5.37 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 5.30 – 5.15 (3H, m), 5.00 (1H, dd, $J = 10.5$ Hz, $J = 3.5$ Hz), 4.50 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 4.38 – 4.30 (1H, dd, $J = 13.3$ Hz, $J = 5.0$ Hz), 4.22 – 4.04 (3H, m), 3.88 (1H, t, $J = 6.7$ Hz), 2.14 (3H,s), 2.05 (3H,s), 2.04 (3H,s), 1.96 (3H,s).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 170.3, 170.2, 170.1, 169.4, 133.4, 117.5, 100.1, 71.0, 70.7, 70.0, 68.9, 67.1, 61.3, 20.6 (4 C).

Synthesis of 3-(thioacetyl)propyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranoside

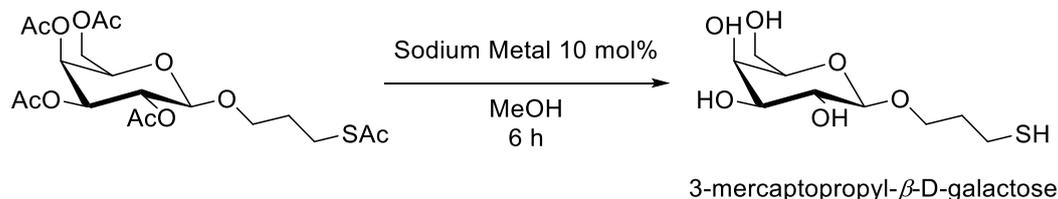


To a stirred solution of allyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranoside (1 equiv., 4.77 mmol, 1.85 g) in chloroform (1 mL) was added thioacetic acid (1 equiv., 4.77 mmol, 340 μL) followed by 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone (DPAP, 2 mol%, 95.4 μmol , 24 mg) under Ar atmosphere. The reaction mixture was irradiated with black light bulbs (Rayonet system, 350 nm) with stirring for 24 hours. The chloroform was evaporated and the crude product was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 70/30 v/v) to afford the title compound (1.82 g, 82 %) as a colorless oil. The product is characterized by ^1H and ^{13}C NMR in CDCl_3 . Analytical data were in agreement with those reported in the literature.⁴

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 5.38 (d, $J = 3.4, 1.2$ Hz, 1H), 5.19 (dd, $J = 10.5, 7.9$ Hz, 1H), 5.01 (dd, $J = 10.5, 3.4$ Hz, 1H), 4.45 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.14 (ddd, $J = 11.2, 6.7$ Hz, 2H), 3.97 – 3.85 (m, 2H), 3.60 – 3.48 (m, 1H), 2.99 – 2.83 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.95 – 1.75 (m, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 195.8, 170.5, 170.4, 170.3, 169.6, 101.5, 71.1, 70.8, 69.0, 68.4, 67.2, 61.4, 31.8, 29.5, 25.8, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7.

Synthesis of 3-mercaptopropyl- β -D-galactopyranoside



To a stirred solution of 3-(thioacetyl)propyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranoside (1 equiv., 3.23 mmol, 1.5 g) in dry methanol (30 mL) was added sodium metal (10 mol%, 0.3 mmol, 7 mg). The reaction mixture was stirred for 6 hours and Dowex 50W H⁺ form was added to neutralize ions. The resin was filtered and the filtrate was

concentrated under reduced pressure at 0° C to afford the title compound in mixture (2/5) with the disulfide form (832 mg, quantitative) as a sticky colorless syrup. The product is characterized by ¹H and ¹³C NMR in D₂O. Analytical data were in agreement with those reported in the literature.⁵

¹H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ /ppm: 4.43 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.15 – 3.99 (m, 2H), 3.96 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 3.87 – 3.65 (m, 3H), 3.61 – 3.47 (m, 2H), 2.69 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.96 (p, $J = 6.7$ Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz; Deuterium Oxide) δ /ppm: 104.9, 76.54, 74.9, 72.5, 70.2, 68.6, 62.4, 30.4, 21.6.

V.2.b. Galactose grafting onto polymers

The procedure for the synthesis of glycosylated polymers, and in particular the used reagents quantities, is detailed for GwD-148.

In a reactor closed with a glass cap, 40.3 mg of polymer (SAK-4, $2.31 \cdot 10^{-6}$ mol, 1 eq) were solubilized in 2.1 mL of EtOH. 3-mercaptoethylgalactose (11.7 mg, $4.6 \cdot 10^{-5}$ mol, 20 eq) was solubilized in 0.2 mL of EtOH and added to the reactor medium with 0.061 μ L of TBHP (solution at 70 % in water). Then, the reactor medium was stirred under UV light during 24 h. After complete reaction, the reaction medium was dialyzed against EtOH and the product was recovered by solvent evaporation. At the end, the yellowish product was characterized by ¹H NMR in deuterated water.

The different conditions (reactor, equivalents, time, UV lamp) were specified in respective tables.

Two different UV lights were used: The first one was a 4 Watts lamp at 365 nm, the second one was a Rayonnet (RPR-200 model reactor) equipped with 14 lamps (35 Watts, 350 nm) and an air cooling system (it's important to note that only 7 lamps were switched on for experiments with this apparatus).

Part III. Biological protocol

I. Materials

I.1. Plasmids

All tests of transfection and cytotoxicity *in vitro* and *in vivo* were done with the *pCMV-luc* plasmid (*pTG11033*, 9514 bp, Transgene S.A., Strasbourg, France) coding for the firefly luciferase gene (*luc*) under the control of the human cytomegalovirus promoter (CMV).

I.2. Reagent and buffer

Unless indication, all products used were from Sigma-Aldrich. Eagle's minimum essential medium (MEM), foetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin solution (penicillin 10.000 IU.mL⁻¹ and streptomycin 10 mg.mL⁻¹), the phosphate buffered saline (PBS) and the HEPES came from PAA Laboratories, Les Mureaux, France (Solution of 10 mM HEPES was prepared in distilled water). The agarose was from Lonza.

I.3. Cells

In this work, we used two different cells lines: HepG2 cells which are human hepatoblastoma cells (ATTC 8065 HB) and HeLa cells which are human cancer cells (CCL2, ATCC)

II. Polyplexes formulation

II.1. Standard method

Polyplexes were prepared with different weight ratio polymer/*pDNA* (WR) in HEPES 10 mM (pH 7,4). The appropriated quantity of polymer (solution at 0,5 mg.mL⁻¹ or at 5 mg.mL⁻¹) was added quickly drop by drop to a *pDNA* solution at 0.0714 µg.mL⁻¹ or 0.714 µg.mL⁻¹ with vortex stirring. Volumes of each solution are indicated in respective tables.

II.2. Extrusion method

Polyplexes were prepared with different weight ratios polymer/*pDNA* (WR) in HEPES 10 mM (pH 7.4). The appropriated quantity of polymer was added in the *trans* compartment. A

metallic prefilter and a seal were placed to close it. In the *cis* compartment, the *p*DNA solution was added with a second prefilter and a seal. A polycarbonate membrane was placed between the two prefilters. The two compartments were fixed and the extrusion of the *cis* compartment into the *trans* one was processed with air pressure monitored by a manometer. Volumes, concentrations, WR and extrusion parameters are mentioned in respective tables.

The optimized protocol is the following one:

The polymer solution was prepared and acidified to reach pH 4.5 (pH meter control). This solution was placed in the *trans* compartment and a metallic prefilter previously soaked in the polymer solution at pH 4.5 was placed with a seal. For the *cis* compartment, the DNA solution was added and the metallic prefilter soaked in Hepes 10 mM solution was placed. The polycarbonate membrane was also soaked in Hepes solution (the two faces) before to place it between the two compartments. After monitored the desired air pressure, the extrusion can be done. The *trans* compartment solution was collected in Eppendorf tube. After 30 min, DLS analysis can be performed.

In the case of large volume was required (more than 0.5 mL), several extrusions were performed without cleaning between each, only the membrane was changed.

To clean the apparatus, cleaning extrusions were done without membrane: the first one was performed with 500 μ L of NaOH 0,1 M in each compartment, the second and the third one were performed with 500 μ L of distilled water in each compartment. Between each cleaning extrusion, the prefilters were placed in a beaker with NaOH 0,1 M solution (between the 1st and the 2nd cleaning extrusion) and with a distilled water solution (between the 2nd and the 3rd cleaning extrusion) for 5 min of ultrasonic cleaning. At the end, compartments and prefilters were washed with ethanol.

III. Size and zeta potential evaluation of polyplexes

Polyplexes were analyzed by DLS 30 minutes minimum after formulation with two different apparatus.

The first one used in IPCM was a Zetasizer Nano S90 from Malvern (90 ° angle, 5 mW He-Ne laser at 633nm).

The second one used in Orléans was a SZ-100 Nanopartica from Horiba (Les Ulis, France). Samples were illuminated with a 10 mW laser at 532 nm. The light scattering was measured at 90 °C for the size and at 13° for the zeta potential.

IV. Electrophoretic mobility shift assays

Free *p*DNA and polyplexes were analyzed on a 0.6% agarose gel. Gel running buffer was TAE (Tris base, acetic acid and EDTA) and *p*DNA gel was stained with Sybr safe (solution diluted 20000x). The migration was running for 30 min at 120 V.

V. Transfection efficiency of polyplexes

24-well plates were seeded with cells at $1.5 \cdot 10^5$ cells/well in 1 mL of culture medium. After 24 h of culture, the medium was discarded and cells were incubated during 4 h at 37 °C with polyplexes (1 µg of DNA/well) in 500 µL of cell culture medium with 10 % of FBS. Then, the medium containing polyplexes was discarded and replaced by 1 mL of standard culture medium (10 % of FBS no decomplexed, 0.4 % of penicillin and streptomycin and 1 % of glutamax). After 48 h, the luciferase activity in cell lysate was measured with a luciferase dosage kit (Promega, E1500) and a luminometer (LUMAT LB 9507). The luciferase activity was normalized by the total quantity of proteins measured by the BCA protein dosage (Uptima, Interchim SA, Montuçon, France) and was expressed in relative luminescent unit (RLU) per mg of protein. For one polyplexe type given, the transfection was performed in triplicate.

VI. Cytotoxicity of polymers

24-well plates were seeded with cells at $1.5 \cdot 10^5$ cells/well in 0.9 mL of culture medium. After 24 h of culture, 100 µL of polymer solutions in HEPES 10 mM were added (all concentrations were tested in triplicate).

After 48 h, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; 100 µl of $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ solution in PBS, yellow color) was added in culture wells. After 4 h incubation at 37 °C, the culture medium was discarded and the formazan synthesized was solubilized by adding acidic isopropanol (HCl at $3.6 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and 200 µL of sodium dodecylsulfate (SDS) at 3% in water. After 30 min incubating at ambient temperature, 200 µL were collected and added in triplicate in a 96-well plate (As 3 wells of the 24-well plate represent the same concentration, the cytotoxicity was calculated with 9 well in the 96-well plate). The absorbance at 570 nm was measured with Victor I spectrophotometer and

cytotoxicity expressed as a percentage of absorbance relative to control cells (cells without any treatments).

VII. *In vivo* experiment

8-weeks old female Balbc mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and were maintained under specific-pathogen free conditions, and manipulations were performed according to European Economic Community guidelines and approved by the local ethics committee (Saisine: N°1145; Apafis: N°19672). Shaved mice were intravenously (IV) injected with 200 μ l of polyplexes in water 5 % glucose in the tail vein. 5 mice were injected per formulation. The transfection efficacy was measured by non-invasive imaging of luciferase activity at indicated times. Mice received first an intraperitoneal injection of luciferin (Xenolight D-luciferine, Perkin Elmer, France) at the dose of 2 mg/mice. Four minutes later, animals were anesthetized by isofluran inhalation (4 % air-isofluran blend) and they were introduced inside an *in vivo* imaging system (IVIS Lumina II, Perkin Elmer, France). Luminescence images were captured at 8 \times 8 binning during an exposure time of 5 min. Signal intensity was then quantified within each region of interest, being expressed as Photon/Second ($\text{Ph}\cdot\text{sec}^{-1}$).

References

- (1) Bennevault-Celton, V.; Urbach, A.; Martin, O.; Pichon, C.; Guégan, P.; Midoux, P. Supramolecular Assemblies of Histidinylated α -Cyclodextrin in the Presence of DNA Scaffold during CDplexes Formation. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (12), 2404–2414. <https://doi.org/10.1021/bc200167p>.
- (2) van Kuringen, H. P. C.; de la Rosa, V. R.; Fijten, M. W. M.; Heuts, J. P. A.; Hoogenboom, R. Enhanced Selectivity for the Hydrolysis of Block Copoly(2-Oxazoline)s in Ethanol-Water Resulting in Linear Poly(Ethylene Imine) Copolymers. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33* (9), 827–832. <https://doi.org/10.1002/marc.201200046>.
- (3) Markey, L.; Giordani, S.; Scanlan, E. M. Native Chemical Ligation, Thiol–Ene Click: A Methodology for the Synthesis of Functionalized Peptides. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (9), 4270–4277. <https://doi.org/10.1021/jo4001542>.
- (4) Kurimoto, K.; Yamamura, H.; Miyagawa, A. Functionalization of Aglycones on Sialoside Derivatives to Generate Precursors for Biological Applications. *Chem. Lett.* **2015**. <https://doi.org/10.1246/cl.151003>.
- (5) A. Ashmus, R.; S. Schocker, N.; Cordero-Mendoza, Y.; F. Marques, A.; Y. Monroy, E.; Pardo, A.; Izquierdo, L.; Gállego, M.; Gascon, J.; C. Almeida, I.; Michael, K. Potential Use of Synthetic α -Galactosyl-Containing Glycotopes of the Parasite *Trypanosoma Cruzi* as Diagnostic Antigens for Chagas Disease. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (34), 5579–5583. <https://doi.org/10.1039/C3OB40887F>.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans ce projet, l'objectif était de développer de nouveaux polyplexes furtifs et polyvalents contenant un unique plasmide. Basé sur les résultats des thérapies géniques virales, il nous est apparu important de maîtriser les tailles des polyplexes afin de pouvoir passer les diverses barrières biologiques. Pour cela, un objectif de taille inférieure à 100 nm a été fixé. D'autre part, afin d'augmenter le temps de circulation du traitement dans l'organisme, il a semblé important de designer des nanoparticules furtives. Dans ce but, nous nous sommes intéressés à la POxylation des complexes en remplacement de la stratégie standard de PEGylation qui démontre aujourd'hui ses limites. Enfin, pour optimiser le transfert de gènes, l'ajout de greffons améliorant le ciblage cellulaire et l'échappement de l'endosome a également été étudié.

Afin de remplir ce cahier des charges, la synthèse de copolymères à blocs comportant une partie polyéthylènimine cationique et une partie poly(2-oxazoline) hydrophile a été revisitée. Celle-ci était, auparavant, uniquement réalisée par couplage de deux chaînes macromoléculaires entre-elles engendrant alors des limitations de rendement. Pour la première fois, des copolymères à blocs doubles hydrophiles de type polyéthylènimine-*b*-poly(2-oxazoline) ont été synthétisés par une méthode originale d'hydrolyse sélective de précurseurs à blocs poly(2-oxazolines)s. Pour cela, le caractère thermosensible des copolymères poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-*b*-poly(2-méthyl-2-oxazoline) a été mis à profit : l'autoorganisation des chaînes macromoléculaires en micelles à haute température permet de protéger le bloc poly(2-isopropyl-2-oxazoline) de l'hydrolyse lors de l'ajout d'acide : seule la couronne poly(2-méthyl-2-oxazoline) de la micelle est alors hydrolysée. Cette hydrolyse réalisée dans un mélange de solvant eau/éthanol en présence d'acide chlorhydrique et à reflux a ainsi permis la synthèse des copolymères PEI-*b*-PiPrOx visés.

Dans le but d'une synthèse de nanoparticules polyvalentes optimisant le transfert de gènes, ces polymères PEI-*b*-PiPrOx ont ensuite été fonctionnalisés. L'apport bénéfique de l'histidine en transfert de gènes étant reporté, les copolymères ont été modifiés statistiquement par des résidus histidine dans le but d'obtenir des PEI(his)-*b*-PiPrOx. Une mise au point des conditions utilisées pour des homopolymères PEI a été nécessaire et des résultats concluants ont, uniquement, été obtenus pour les PEI(his)-*b*-PiPrOx de haute masse molaire (10 à 18,7 % de modification). Puis, afin de permettre un ciblage cellulaire actif du traitement de thérapie génique, le greffage de motifs galactose a semblé pertinent pour l'application thérapeutique visée (thérapie génique des poumons et du foie). Les récepteurs du galactose étant multivalents, une fonctionnalisation multifonctionnelle du polymère permet une meilleure

Conclusion générale

interaction avec ces récepteurs et ainsi une augmentation du ciblage cellulaire. C'est pourquoi, des dérivés du galactose ont été greffés par chimie click *via* un couplage thiol-yne sur l'extrémité PiPrOx hydrophile des copolymères PEI-*b*-PiPrOx. Cette méthode de greffage permet de bénéficier d'un couplage bifonctionnel. Un modèle PiPrOx a montré une fonctionnalisation de 53 % des fonctions alcynes terminales par deux dérivés galactose. Puis, la même stratégie a permis la fonctionnalisation des copolymères PEI-*b*-PiPrOx de haute masse molaire avec un taux de couplage de 100 %. Enfin, une étude préliminaire sur la synthèse de polymères poly(2-oxazoline)s portant un groupement fluorescent de type dansyle a été réalisée dans l'objectif d'une thérapie génique théranostique. L'investigation plus poussée de cette fonctionnalisation est nécessaire en étudiant, notamment, l'hydrolyse des polymères obtenus.

Ainsi, après la synthèse de ces nouvelles familles de polymères (PEI-*b*-PiPrOx, PEI(his)-*b*-PiPrOx et PEI-*b*-PiPrOx-Gal), la formulation de complexes a été étudiée dans le but d'évaluer leur capacité de transfection *in vitro* et *in vivo* en comparaison aux lPEI témoins.

Cependant, la formulation classique de polyplexes à base de PEI ne permet pas, aujourd'hui, l'obtention de solutions stables de complexes de petite taille et à haute concentration nécessaires aux tests *in vivo*. En effet, une précipitation des agrégats dont la taille est supérieure à 1 μm est observée aux concentrations visées. C'est pourquoi, une nouvelle méthode originale de formulation permettant, pour la première fois, l'obtention de solutions aux concentrations en ADN ρ similaires aux thérapies virales a été mise au point au cours de cette thèse. Cette technique de formulation dite par « extrusion » vise à complexer les molécules d'ADN ρ ajoutées une par une dans la solution de polymère. Pour cela, une solution d'ADN concentrée est extrudée à travers une membrane nanoporeuse de 30 nm dans une solution de polymère concentrée à pH 4,5 avec une pression de 1 bar. Des complexes d'un diamètre hydrodynamique compris entre 70 et 350 nm à une concentration en ADN comprise entre 0,05 mg/mL et 0,5 mg/mL sont alors obtenus. Pour la première fois, des solutions stables avec une concentration en ADN équivalente à celle des thérapies virales sont obtenues et ouvrent la voie aux tests *in vivo*.

Ces complexes innovants de part leur méthode de formulation mais également par leur structure ont alors été le sujet de tests *in vitro* et *in vivo*.

Tout d'abord, la formulation par extrusion a pu être mise en avant en démontrant une complexation plus efficace de l'ADN p tout en conservant, *in vitro*, l'efficacité de transfection des complexes réalisés par formulation classique. Cette méthode de formulation prometteuse a alors pu être utilisée dans le cadre d'expériences sur petits animaux.

Les tests biologiques réalisés ont démontré l'importance de revisiter la structure de la PEI. En effet, la *l*PEI montre une toxicité *in vitro* et *in vivo*. Sa fonctionnalisation par l'histidine permet une diminution de cette toxicité et une efficacité de transfection accrue cependant lors des transfections *in vivo* à des concentrations importantes en ADN p (et donc en polymères), une toxicité importante reste observée.

C'est pourquoi, les études de l'équipe sur la structure des polymères PEI sont primordiales. Les complexes formés avec les PEI en étoile développées dans le cadre d'une précédente thèse et les copolymères mis au point tout au long de ce manuscrit présentent un transfert de gènes sûr et efficace même lors des tests *in vivo* à une concentration en ADN p similaire aux virus. Les souris ont, en effet, bien toléré le traitement et une transfection a pu être observée.

En ce qui concerne les complexes fonctionnalisés, des études à des WR_{PEI} plus élevés pour la fonctionnalisation par l'histidine sont nécessaires afin de pouvoir observer une bonne complexation de l'ADN et une efficacité de transfection accrue. D'autre part, la synthèse des copolymères fonctionnalisés par le galactose doit être optimisée afin d'obtenir des polymères complètement hydrophiles. Cette modification permettra de rendre plus disponible les groupements galactose en surface des complexes et ainsi réaliser un ciblage cellulaire efficace.

Ainsi, au cours de cette thèse, divers progrès en thérapie génique non virale ont pu être observés. La synthèse de nouveaux complexes POxylés concentrés en ADN p et de petites tailles a permis la réalisation de transferts de gènes *in vivo* efficaces et sûrs. Cette avancée très importante ouvre de nouveaux espoirs à l'utilisation de la PEI en transfert de gènes *in vivo*.

Les perspectives de ce travail sont multiples tant au niveau de la synthèse macromoléculaire qu'au niveau des essais biologiques.

Tout d'abord, les résultats importants montrés par les copolymères PEI-*b*-PiPrOx nous amènent à accorder de l'importance à cette structure et donc à ses fonctionnalisations. Il

Conclusion générale

semble, alors, nécessaire d'optimiser les fonctionnalisations par l'histidine et par le galactose afin de réaliser ces greffages sur toute la bibliothèque de copolymères. En ce qui concerne la fonctionnalisation par le galactose, des problèmes de solubilité du polymère ont été soulevés lors de la formulation des complexes. L'enchaînement carboné créé lors de la fonctionnalisation étant hydrophobe, une oxydation de la liaison thioéther en sulfone pourrait être envisagée afin de rendre le polymère totalement hydrophile. D'autre part, l'avantage de la thérapie génique non virale par rapport aux virus est la polyvalence du système polymère en regard des cellules cibles : la fonctionnalisation des chaînes macromoléculaires par un autre ligand cellulaire permettrait de synthétiser une nouvelle famille de polymère ciblant un nouveau type cellulaire et donc de nouvelles maladies.

En ce qui concerne la formulation des complexes, des études plus poussées en Cryo-TEM afin d'analyser la structure des complexes en fonction de l'architecture, de la masse molaire ou encore de la fonctionnalisation du polymère apporteraient des informations complémentaires nécessaires à la compréhension des résultats biologiques. De plus, des efforts sont encore à fournir sur la formulation par extrusion dans le but d'obtenir des complexes d'un diamètre hydrodynamique inférieur à 100 nm quelle que soit la concentration en ADN ou le polymère utilisé. Il serait également intéressant de réaliser des analyses démontrant la furtivité des complexes permise par la POxylation réalisée.

Les études biologiques de ces nouveaux polymères et nouveaux complexes seront nécessaires pour évaluer l'impact sur la cytotoxicité et la transfection des cellules *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats permettront de mettre en avant les polymères et les formulations prometteurs pour l'avenir de la thérapie génique non virale.

D'autre part, dans un objectif de thérapie génique à visée des poumons, une administration par aérosolisation est étudiée par un des partenaires de ce projet (Equipe du Pr. Tristan Montier – Brest). Cette méthode d'administration est beaucoup moins invasive qu'une injection par voie intraveineuse. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer les capacités de transfection des complexes par cette méthode. Il faudra cependant réussir à formuler des complexes les plus petits possibles pour pénétrer en profondeur dans les alvéoles pulmonaires.

Synthèse de nanoparticules monoplasmidiques pour le transfert de gènes

Depuis le XX^{ème} siècle, la thérapie génique ouvre la voie au traitement des maladies d'origine génétique et des maladies acquises tels que les cancers ou les maladies neurodégénératives. L'introduction d'un polynucléotide dans les cellules présentant une mutation génétique permet de moduler leur fonctionnement. Néanmoins, afin de passer les différentes barrières biologiques et de rejoindre le noyau des cellules de l'organe ciblé, l'ADN doit être protégé par un vecteur. Divers types de vecteurs ont été développés tels que les vecteurs de polymère à base de PEI. Malgré leur efficacité, ces vecteurs montrent des réactions immunogènes. Des fonctionnalisations sont alors développées pour réduire cette toxicité notamment par la formation de vecteurs furtifs. La stratégie standard de PEGylation montre, cependant, des limites nécessitant l'utilisation de nouveaux polymères hydrophiles.

Dans ce contexte, la POxylation a été étudiée comme une alternative à la PEGylation pour le design de nouveaux polyplexes. Une nouvelle méthode de synthèse de copolymères PEI-*b*-POx par hydrolyse sélective de copolymères à blocs poly(2-R₁-2-oxazoline-*b*-2-R₂-2-oxazoline). a été mise au point ainsi que leur fonctionnalisation par des résidus histidine connus pour améliorer l'efficacité de transfection et diminuer la toxicité du vecteur polymère. Un ligand galactose a été greffé en fin de chaîne hydrophile afin d'induire un ciblage cellulaire. Les polymères synthétisés ont été, ensuite, utilisés pour former des polyplexes avec l'ADN *via* une méthode de formulation dite « par extrusion » avant de réaliser des tests de transfection *in vitro* et *in vivo*. Une réduction de la cytotoxicité a été observée lors de l'utilisation des copolymères PEI-*b*-POx en comparaison aux PEI tout en conservant une efficacité de transfection.

Mots clés : polymérisation cationique par ouverture de cycle ; poly(2-oxazoline)s ; poly(éthylènimine) ; PEGylation alternative ; transfert de gènes.

Synthesis of monoplasmidic nanoparticles for gene transfer

Since 20th century, breakthrough in gene therapy paves the way for new therapeutic strategies against genetic disorders, cancers and neurodegenerative diseases. Cells with genetic mutation may have their cellular machinery modulated via the introduction of polynucleotides in their nucleus. Nevertheless, DNA needs to be protected by a vector to cross biological barriers and to reach targeted cell nucleus. Various types of vectors have been developed like PEI-based vectors. However, those efficient polymeric vectors exhibit a toxicity which can be lowered by PEG functionalization. Nevertheless, the well-known PEGylation approach shows limits requiring news hydrophilic polymers.

In this context, POxylation was studied as PEG alternatives in the design of new *p*DNA containing nanovectors. A new synthetic strategy was developed with a selective hydrolysis of block poly(2-R₁-2-oxazoline-*b*-2-R₂-2-oxazoline) copolymers. The functionalization of the synthesized PEI-*b*-POx copolymers with histidine moieties was achieved, along with galactose grafting to induce cellular targeting or histidine grafting to improve endosomal escape. These polymers were used to form polyplexes with DNA *via* extrusion method and further biological testing via *in vitro* and *in vivo* transfection essays were performed. An efficient transfection was obtained with a reduction of the cytotoxicity for PEI-*b*-POx copolymers compared to PEI.

Keywords: cationic ring opening polymerization; poly(2-oxazoline)s; poly(ethylenimine); PEGylation alternative; gene transfert.