

Mise au point de nanoparticules polycationiques pour le transfert de gènes

Myriem Gargouri

▶ **To cite this version:**

Myriem Gargouri. Mise au point de nanoparticules polycationiques pour le transfert de gènes. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10061 . tel-01746362

HAL Id: tel-01746362
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746362

Submitted on 29 Mar 2018

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

ECOLE DOCTORALE BIOSE « BIOLOGIE - SANTE - ENVIRONNEMENT »

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

Mention « Sciences de la vie et de la Santé »

par **Myriem GARGOURI**

Mise au point de nanoparticules polycationiques pour le transfert de gènes

Le 5 octobre 2010

MEMBRES DU JURY :

Rapporteurs :

Monsieur Hatem FESSI (Professeur, Faculté de Pharmacie, Lyon)

Madame Gillian BARRATT (Docteur-CNRS, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry)

Examinateurs :

Monsieur Joseph ABECASSIS (Docteur-Etat Pharmacie, Centre Paul Strauss, Strasbourg)

Monsieur Philippe BECUWE (Professeur, Faculté des Sciences, Nancy)

Monsieur Philippe MAINCENT (Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy), Directeur de thèse

Monsieur Jean-Louis MERLIN (Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy), Co-directeur de thèse

EA 3452 – Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie, Faculté de Pharmacie de Nancy

5, rue Albert LEBRUN BP 80403 – 54001 NANCY Cedex 01

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Voilà la définition que je donnerais à ma thèse : un rêve devenu réalité. Et je n'étais pas seule dans ce rêve. Je tiens donc à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de rêver et de rendre ce rêve réalité.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Philippe MAINCENT qui m'a accueillie au sein du laboratoire de Pharmacie Galénique de la Faculté de Pharmacie. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée depuis mon stage de Master jusqu'à la fin de ma thèse.

Je tiens également à remercier Messieurs les Professeurs Jean-Louis MERLIN et Philippe BECUWE d'avoir accepté de co-diriger ce travail après la disparition de Madame le docteur Nathalie UBRICH. Je les remercie pour leurs conseils, leur écoute et pour leur disponibilité.

Je remercie le Professeur Hatem FESSI et le Docteur Gillian BARRAT d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Docteur Joseph ABECASSIS de me faire l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma gratitude à Madame le Docteur Anne SAPIN-MINET pour sa gentillesse, son soutien et ses encouragements ainsi que toutes les conversations que nous avons eues. Je tiens également à remercier le Professeur Claude VIGNERON pour son aide et ses corrections.

Je n'oublierai pas de remercier mes collègues, et toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au laboratoire pour toutes nos discussions et les bons moments passés ensemble. Je pense tout particulièrement à Cristina, Javier, Housam, Marie, Juliana, Christophe, Paulo, Fatima, et bien d'autres……

Je remercie également l'équipe du laboratoire du Professeur Philippe BECUWE qui m'a toujours accueillie à bras ouvert.

Je remercie également l'équipe du laboratoire du Professeur Jean-Louis MERLIN, et en particulier Sanae BOUALI qui m'a aidé pendant mes 2 premières années de thèse. Merci de m'avoir appris la transfection, l'utilisation du cytomètre en flux et d'autres techniques. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et pour tous les moments qu'on a passés ensemble.

Je souhaite dédier ma thèse et remercie en particulier mon mari à qui j'adresse toute mon affection et ma tendresse. Merci d'avoir été à mes cotés pendant ces moments difficiles, de doute et surtout d'avoir cru en moi. Merci pour ta présence, ton soutien et surtout tes encouragements.

Je souhaite également dédier ma thèse à ma famille qui a su m'encourager. Merci à mes deux frères qui m'ont toujours encouragé pour réussir dans mes études, et cru en moi. Je remercie mon papa, et particulièrement ma maman à qui je dédie cette thèse du fond de mon cœur, sans vous je n'y serai jamais arrivée. Vous m'avez toujours facilité ce long parcours, aucun remerciement ne pourrait suffire.

Encore merci a tous…..

REMERCIEMENTS **3**

LISTES DES FIGURES **9**

LISTES DES TABLEAUX **10**

LISTES DES ABREVIATIONS **11**

INTRODUCTION **14**

ETUDE BIBLIGRAPHIQUE **17**

1 LA THERAPIE GENIQUE 17

1.1 DEFINITION DE LA THERAPIE GENIQUE 17

1.2 LES DIFFERENTES STRATEGIES DE LA THERAPIE GENIQUE 17

2 PRESENTATION DES DIFFERENTS VECTEURS POUR LA TRANSFECTION 18

2.1 L'ADN NU PLASMIDIQUE 20

2.2 LES VECTEURS VIRAUX 22

2.2.1 LES RETROVIRUS 23

2.2.2 LES ADENOVIRUS 26

2.2.3 LES VIRUS ASSOCIES AUX ADENOVIRUS (AAV) 28

2.2.4 LES HERPES VIRUS SIMPLEX (HSV) 29

2.3 LES VECTEURS NON VIRAUX 30

2.3.1 LES LIPOPLEXES 32

2.3.2 LES POLYPLEXES A BASE DE POLYMERES CATIONIQUES 35

2.3.2.1 LE CHITOSANE 36

2.3.2.2 LES PEPTIDES 37

2.3.2.3 LA POLY(L-LYSINE) PLL 39

2.3.2.4 LA POLY(ETHYLENIMINE) 41

2.3.3 LES CYCLODEXTRINES 45

2.3.4 LES DENDRIMERES 47

2.3.5 LES PARTICULES POLYMERIQUES 50

3 LES DIFFERENTES ETAPES ET LES MECANISMES DU TRANSFERT DE GENES PAR LES VECTEURS NON VIRAUX 58

3.1 LE TRAFIC EXTRACELLULAIRE 59

3.2 L'ENTREE DANS LA CELLULE 60

3.3 LE TRAFIC INTRACELLULAIRE 61

3.4 LA TRANSCRIPTION 62

3.5 EXPRESSION CYTOPLASMIQUE DU TRANSGENE 62

4 LES METHODES PHYSICOCHIMIQUES AMELIORANT LA TRANSFECTION 63

4.1 LES METHODES PHYSIQUES 63

4.1.1 MICROINJECTION 63

4.1.2 CANON A ADN 64

4.1.3 SONOPORATION *64*

4.1.4 IRRADIATION LASER *64*

4.1.5 INJECTION HYDRODYNAMIQUE *65*

4.1.6 ELECTROPORATION *65*

5 INTERNALISATION PHOTOCHIMIQUE (PCI) 66

5.1 HISTORIQUE *66*

5.2 PRINCIPE DE L'INTERNALISATION PHOTOCHIMIQUE *67*

5.2.1 CHOIX DE LA DOSE DE LUMIERE *69*

5.2.2 CHOIX DU PHOTOSENSIBILISANT *70*

5.2.3 CHOIX DE LA LIGNEE CELLULAIRE *70*

ETUDE EXPERIMENTALE **73**

1 ARTICLE 1 : OPTIMISATION DE NANOPARTICULES D'EUDRAGIT® RS ET RL POUR LE TRANSFERT D'UN PLASMIDE. 76

2 ASSOCIATION DES NANOPARTICULES D'EUDRAGIT® RS OU RL AVEC LA TECHNIQUE D'INTERNALISATION PHOTOCHIMIQUE : TENTATIVE D'AMELIORATION DE L'EFFICACITE DE TRANSFECTION. 90

2.1 INTRODUCTION *90*

2.2 MATERIELS ET METHODES *91*

2.2.1 TECHNIQUE D'INTERNALISATION PHOTOCHIMIQUE (PCI) ET OPTIMISATION DES PARAMETRES *91*

2.2.2 FABRICATION DES NANOPARTICULES « OUTIL-VECTEUR D'ADN ». *93*

2.2.3 CYTOTOXICITE DES NANOPARTICULES D'EUDRAGIT® ASSOCIEES A LA PCI SUR LES CELLULES FADU. *94*

2.2.4 TRANSFECTION DES CELLULES FADU PAR LES NANOPARTICULES D'EUDRAGIT® ASSOCIEES A L'INTERNALISATION PHOTOCHIMIQUE. *94*

2.3 RESULTATS ET DISCUSSION. *95*

2.3.1 OPTIMISATION DES PARAMETRES DE LA TECHNIQUE DE PCI SUR LES CELLULES FADU. *95*

2.3.2 CYTOTOXICITE DES NANOPARTICULES ASSOCIEES A LA PCI SUR LES CELLULES FADU. *101*

2.3.3 TRANSFECTION DES CELLULES FADU A L'AIDE DES NANOPARTICULES ASSOCIEES A LA PCI. *102*

2.4 CONCLUSION *105*

3 ARTICLE 2 : EVALUATION DU TRANSFERT DE GENES DE NANOPARTICULES DE PLGA ET PEI COUPLEE A LA METHODE D'INTERNALISATION PHOTOCHIMIQUE. 107

DISCUSSION GENERALE **141**

1 DEVELOPPEMENT D'UN « OUTIL-VECTEUR D'ADN MEDICAMENT ». 142

1.1 LE CAHIER DES CHARGES ET LES PARAMETRES DE FORMULATIONS CHOISIS. *142*

1.1.1 LES POLYMERES POLYCATIONIQUES UTILISES. *142*

1.1.2 L'ASSOCIATION A L'ADN *144*

1.1.3 UN PROCEDE SIMPLE DE FORMULATION *146*

1.1.4 DES TAILLES DE PARTICULES COMPATIBLES AVEC LA TRANSFECTION. *147*

1.1.5 UNE ADSORPTION EFFICACE DE L'ADN OU DES COMPLEXES POLYMERES POLYCATIONIQUES/ADN *147*

1.1.6 DES VECTEURS PEU CYTOTOXIQUES ET EFFICACES EN TRANSFECTION : UN JUSTE EQUILIBRE A TROUVER. *151*

1.2 LES PARTICULES DE PLGA-PEI/ADN : UN VECTEUR PROMETTEUR ? 159

2 OPTIMISATIONS POSSIBLES ET PERSPECTIVES 160

2.1 OPTIMISATION DE LA FORMULATION 160

2.2 AMELIORER LE PASSAGE DES MEMBRANES 161

3 CONCLUSION 164

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 168

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Les vecteurs viraux et non viraux utilisés en essais cliniques. *19*

Figure 2 : Représentation schématique du cycle d'infection des rétrovirus. *25*

Figure 3 : Principe du transfert de gènes par un lentivirus. *26*

Figure 4 : Principe du transfert de gène par adénovirus. *27*

Figure 5 : Structure caractéristique des lipides cationiques utilisés en transfection [35]. *32*

Figure 6 : Structure chimique des principaux lipides cationiques utilisés dans le transfert de gènes. *33*

Figure 7 : Exemples d'assemblages possibles pour les molécules amphiphiles dans un solvant aqueux : a)micelles et micelles inverses, b) bicouche, c) liposomes, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse (arrangement de micelles cylindriques inverses), f) phase éponge, g) phase cubique directe bicontinue [42]. *34*

Figure 8 : Structure d'une unité polymérique du chitosane. *36*

Figure 9 : Structure chimique de la poly-L-lysine. *39*

Figure 10 : Formule chimique de PEI branché et linéaire. *42*

Figure 11: Représentation de la structure chimique des cyclodextrines naturelles [95]. *45*

Figure 12: Représentation schématique d'une cyclodextrine polycationique amphiphiles [102]. *47*

Figure 13 : Dendrimère de type PAMAM de 2ème génération. *47*

Figure 14 : Représentation schématique des nanoparticules et des microparticules. *51*

Figure 15 Les barrières du transfert de gènes. *58*

Figure 16 Présentation schématique de la réaction photochimique. *68*

Figure 17 : Réalisation in vitro de la technique d'internalisation photochimique. *69*

Figure 18 : Structure chimique du meso-tetraphenylporphyrine disulfonate ($TPPS_{2a}$). *70*

Figure 19: Schéma chronologique des manipulations lors de la transfection avec PCI. *95*

Figure 20 : Expression du taux de transfection du gène GFP en fonction de la quantité de photosensibilisant et du temps d'irradiation (moyenne ± écart-type ; n=9). *97*

Figure 21 : Cytotoxicité en pourcentage de viabilité cellulaire, des nanoparticules d'Eudragit® RS et RL sur les cellules FaDu en association ou non à la méthode d'internalisation photochimique (moyenne ± écart-type ; n=9). *101*

Figure 22 : Taux de transfection en fonction des nanoparticules d'Eudragit® RS et RL avec ou sans internalisation photochimique (moyenne ± écart-type ; n=4) *103*

Figure 23 : Les différentes étapes du transfert de gènes dans une cellule cible. *141*

Figure 24 : Structure chimique de l'Eudragit® RS et RL. *143*

Figure 25 : Migration sur gel d'agarose (0,8%(m/v) ; 90 V/cm) des plasmides libres présents dans les surnageants de particules d'Eudragit RS formulées par simple et double émulsion – évaporation de solvant. La présence d'une traînée témoigne de la dégradation de l'ADN lors du procédé de formulation. *145*

Figure 26 : Mise en évidence de la formation des complexes polymères polycationiques (PEI ou PLL) / ADN par l'extinction de la fluorescence induite par le bromure d'éthidium en présence d'un complexe (A) et par l'observation sur un gel d'agarose (B).....150

Figure 27 : Etude de la transfection des cellules FaDu par le gène rapporteur codant pour la GFP véhiculé par les différentes nanoparticules formulées par le procédé de double émulsion – évaporation de solvant. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules fluorescentes détectées par cytométrie en flux (moyenne ± écart-type ; n=4).....154

Figure 28 : Etude de la cytotoxicité par test MTT des vecteurs formulés par double émulsion- évaporation de solvant sur les cellules FaDu et donnant les taux de transfection les plus élevées. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité (moyenne ± écart-type ; n=9) 154

Figure 29 : Viabilité des cellules FaDu en pourcentage, après 24h de mise en contact avec les nanoparticules de PLGA-PLL/ADN (moyenne ± écart-type ; n=9).....156

Figure 30 : Pourcentage de transfection des cellules FaDu avec la lipofectamine, l'ADN seul, les complexes PLL/ADN et les nanoparticules de PLGA-PLL/ADN (moyenne ± écart-type ; n=4). 158

Figure 31 : Migration sur gel d'agarose (0,8%(m/v) ; 90 V/cm) des complexes PLL/ADN et des nanoparticules de PLGA-PLL/ADN après traitement à la Dnase. La présence d'une traînée témoigne de la dégradation de l'ADN lors du procédé de formulation. 159

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents vecteurs viraux [19, 20]..... 23

Tableau 2 : Avantages/ Inconvénients des vecteurs viraux et non-viraux..... 30

Tableau 3 : Exemples d'agents peptidiques. 38

Tableau 4 : Etudes réalisées avec des microparticules polymériques pour le transfert de gènes (NR : Non renseigné). 55

Tableau 5 : Etudes réalisées avec des nanoparticules de PLGA pour le transfert de gènes. 57

Tableau 6 : Les différents agents utilisées en transfection avec la PCI [164] 67

Tableau 7 : Exemple des différentes lignées cellulaires utilisées dans le transfert de différentes macromolécules et la PCI [165]..... 71

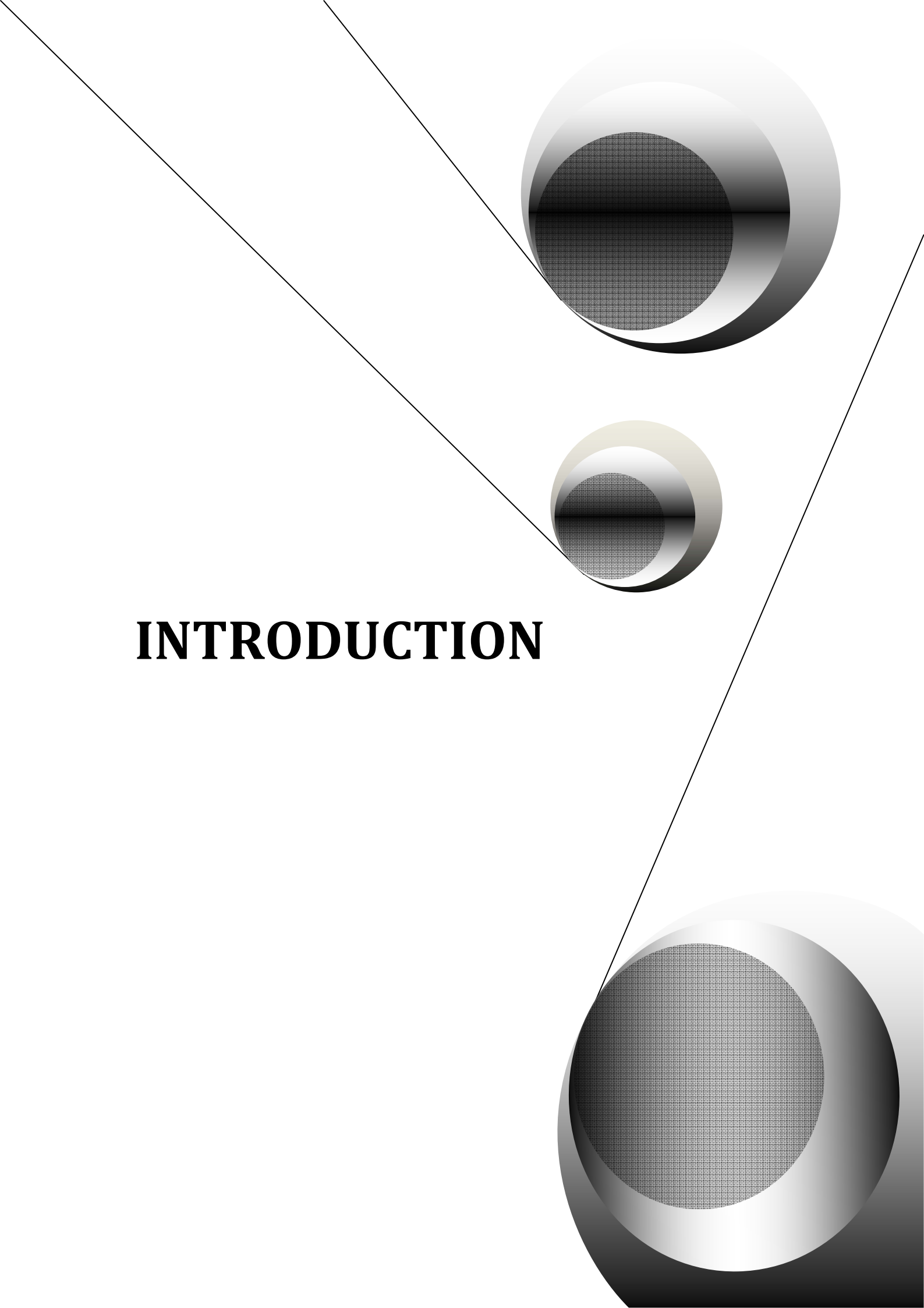
Tableau 8 : Principales études de transfert de gènes associant la PCI aux vecteurs polymériques.....100

Tableau 9 : Potentiel zêta des différents types de vecteurs d'ADN (n=3 ; ND : non déterminé).....148

LISTES DES ABRÉVIATIONS

AAV	Adeno Associated Virus
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN m	Acide ribonucléique messager
cap	Gène pour l'encapsidation
CDs	Cyclodextrines
CF	Fibrose cystique
CFTR	Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator
CPP	Cell Penetrating Peptide
DOGS	Dioctadecylamidoglycylspermine
DOPE	Dioléoylphosphatidyléthanolamine
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
DOTMA	2,3-Dioléoylloxypropyl-1-trimethyl ammonium bromide
Env	Gène de l'enveloppe
FDA	Food and Drug Administration
gag	Group specific antigen
GFP	Green Fluorescent Protein
GUV	Giant unilamellar vesicule
HSV	Herpes Simplex Virus
ITR	Inverted terminal repeats
Kb	Kilo paire de bases
kDa	Kilodalton
LUV	Large Unilamellar Vesicule
LTR	Long Terminal Repeat

MLV	Multilamellar Large Vesicule
MLV	Murine leukemia virus
mM	Millimolaire
MPS	Système phagocytaire Mononucléé
nm	Nanomètre
PAMAM	Polyamidoamine
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Internalisation photochimique
PEG	Polyethylene glycol
PEI	Polyéthylenimine
PLL	Poly (L-lysine)
pol	Gène de la polymérase
PTD	Protein Transduction Domain
rep	Gène pour la réplication virale
SAINT-2	*N*-méthyl-4-(dioleyl) méthylpyridinium
SCID	Immunodéficience sévère combinée
SFDA	State Food and Drug Administration
SUV	Small Unilamellar Vesicule
TR	Transcriptase reverse
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH	Virus immunodéficience humaine



INTRODUCTION

INTRODUCTION

Au milieu du XIXe siècle, Gregor Mendel découvrait la transmission des caractères héréditaires grâce à ses célèbres expériences sur les petits pois. Mais ce n'est qu'en 1910 que la génétique, science de l'hérédité, a véritablement pris un élan grâce à Thomas H. Morgan qui a démontré que les chromosomes sont les supports physiques de l'information génétique. En 1953, la découverte de la structure de l'ADN support de l'hérédité par James D. Watson et Francis H. Crick, a permis de comprendre le rôle d'un gène et comment il pouvait être dupliqué pour fournir une copie exacte lors de la division cellulaire. C'est grâce à toutes ces découvertes que les généticiens peuvent aujourd'hui envisager de décrypter l'intégralité du génome humain, pour connaître les gènes responsables des maladies génétiques chez l'homme, dans l'espoir à la fois de les comprendre et de les traiter.

Au début des années 1980, le développement du génie génétique sonne le début d'une nouvelle révolution médicale : la thérapie génique, dénomination qui recouvre plus un principe général qu'une technique précise. Les méthodes utilisées sont extrêmement diverses, selon que le but est d'obtenir la production d'une protéine active, remplaçant une protéine manquante ou inactive (affections héréditaires), ou un moyen thérapeutique pour lutter contre des maladies comme le cancer. Les techniques de transport du gène à l'intérieur des cellules sont, elles aussi, très variées et peuvent être couplées à d'autres stratégies, notamment vaccinales, ce qui rend encore la démarche plus complexe.

Le projet présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans une thématique multidisciplinaire, faisant appel à la pharmacie galénique mais également à la biologie cellulaire. Le but de notre étude est l'élaboration d'une forme galénique innovante comme vecteur d'ADN, sous forme d'un vecteur nanoparticulaire, susceptible de transporter un gène médicament du milieu

extracellulaire jusqu'au génome. La potentialité de ce nouveau vecteur a été testée en combinaison avec la technique de sensibilisation des cellules que représente l'internalisation photochimique. Le but ultime de cet « outil-vecteur d'ADN », est d'être adapté aux exigences de la transfection, présentable sous forme stable et directement utilisable au chevet du patient.

La revue bibliographique, correspond à la première partie du document, est consacrée à une présentation succincte des vecteurs de gènes viraux, et insiste sur les vecteurs non viraux en présentant le mécanisme de transfection, et les différentes stratégies pouvant être couplées au transfert de gènes, et plus particulièrement l'internalisation photochimique.

La seconde partie de ce manuscrit, aborde les études expérimentales. Il s'agit de la mise au point des nanoparticules à base de polymères polycationiques, puis de leur caractérisation physico-chimique, et enfin de leur évaluation biologique en termes de cytotoxicité et de transfection couplée ou non à l'internalisation photochimique.

En effet, l'ensemble des études consacrées au transfert de gène mentionne la difficulté à trouver le juste équilibre entre une cytotoxicité minimum et une transfection efficace. C'est dans le souci d'approcher un bon compromis que s'inscrivent les études expérimentales décrites dans ce manuscrit.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIGRAPHIQUE

1 LA THÉRAPIE GÉNIQUE

1.1 DÉFINITION DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE

La thérapie génique consiste à introduire un gène fonctionnel comme un médicament dans les cellules d'un organisme pour y corriger une anomalie (mutation, altération) à l'origine d'une pathologie. Elle est à ce jour utilisée pour diverses indications thérapeutiques.

1.2 LES DIFFÉRENTES STRATÉGIES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE

La thérapie génique peut être envisagée selon différentes approches [1] :

- En remplaçant un gène déficient par son ADN complémentaire correspondant et fonctionnel, il s'agit de corriger un défaut de fonction en apportant la protéine manquante. Certaines maladies monogéniques pourraient être traitées de cette façon. Par exemple, la mucoviscidose (dérèglement de la protéine CFTR, Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator, due à une mutation), les myopathies (mutation du gène de la dystrophine pour la myopathie de Duchenne) ou les maladies génétiques du système immunitaire (SCID Severe Combined Immunodeficiency).

- La correction d'une mutation ponctuelle peut être utilisée dans le cas où il n'est pas possible d'ajouter un gène fonctionnel pour remplacer un gène défectueux. Il existe donc une approche alternative qui consiste à accomplir une correction du gène *in situ,* en utilisant par exemple des oligonucléotides hybrides ARN-ADN (chiméraplastes) ou des oligonucléotides simples brins [2].

- L'inhibition du fonctionnement d'un gène muté ou l'inactivation de son produit protéique est utilisée dans les cas ou l'apport d'un gène fonctionnel ne suffit pas. En effet lorsqu'une mutation dans un gène entraîne un gain de fonction, les symptômes de la maladie sont liés à la synthèse d'une protéine anormale à effets délétères.

- L'introduction d'un gène suppresseur de tumeur conduisant à la mort de la cellule malade. Cette technique s'effectue en introduisant un gène apoptotique ou indirectement en sensibilisant par exemple des cellules cancéreuses à des médicaments : on introduit dans les cellules cancéreuses un gène qui code pour une enzyme activant un médicament inactif administré au patient, ce médicament activé détruit alors les cellules cancéreuses [3].

- L'ajout d'un gène au génome d'une cellule pour produire une protéine thérapeutique d'intérêt. Par exemple, l'expression des facteurs de croissance (dans le cas des maladies cardiovasculaires : VEGF), des facteurs de coagulation (facteurs VIII et IX sanguins pour l'hémophilie), des interleukines, l'érythropoïétine (pour la β-thalassémie ou l'anémie), des anticorps monoclonaux [4].

Ainsi, le chapitre suivant tente de donner un aperçu des principales techniques de transfert de gènes.

2 PRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS VECTEURS POUR LA TRANSFECTION

Actuellement, la principale limite de la thérapie génique réside dans le développement de divers systèmes efficaces de transfert d'acides nucléiques permettant le passage des différentes barrières biologiques. Pour prétendre à une efficacité optimale, le vecteur devra présenter diverses caractéristiques telles que:

- être spécifique vis-à-vis des cellules cibles
- sans dissémination du gène dans tout l'organisme
- être résistant aux dégradations métaboliques et/ou attaques par le système immunitaire
- avoir le moins d'effets secondaires possible
- être capable d'exprimer suffisamment et de manière à ce que l'expression du gène d'intérêt thérapeutique soit aussi longue que nécessaire

De nombreuses méthodes de transfert de gènes existent déjà (*Figure 1*). Elles sont classées en deux catégories [1] : le transfert par des vecteurs viraux, et par des approches chimiques ou physiques qualifiées de « non virales ».

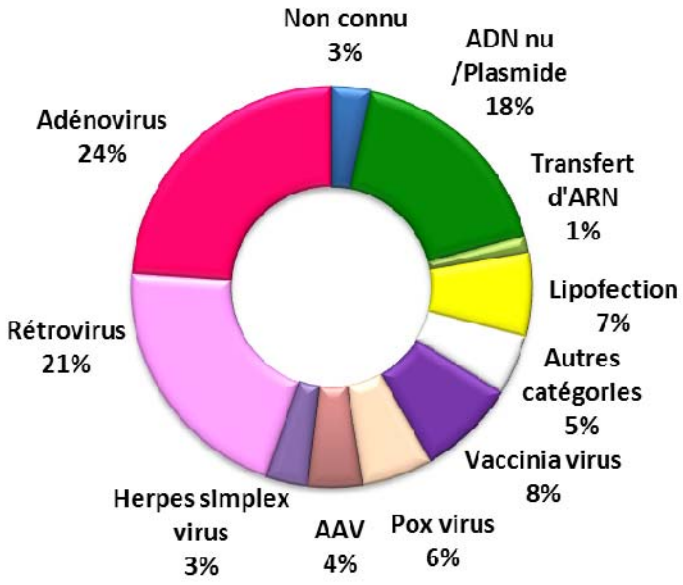


Figure 1 : Les vecteurs viraux et non viraux utilisés en essais cliniques.
Le pourcentage indiqué correspond au nombre de protocoles d'essai cliniques menés avec les différents vecteurs. D'après le site web de Wiley Genetic Medecine : http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/ (Source 2009).

2.1 L'ADN NU PLASMIDIQUE

L'ADN nu plasmidique est un vecteur composé d'un ADN circulaire portant un gène codant pour une protéine d'intérêt. Il présente l'avantage d'être peu immunogène, et permet donc des administrations répétées. Il permet d'engendrer une réponse immunitaire essentielle dans le processus de la vaccination. L'ADN nu a l'avantage de n'avoir aucune limite pour la taille du gène thérapeutique à insérer, d'être facile à produire et surtout peu onéreux.

Cependant, il n'est pourtant pas évident qu'une injection d'ADN permette une transfection de cellules *in vivo*. D'ailleurs, les mécanismes d'entrée dans les cellules *in vivo* restent encore en partie inconnus. Le premier essai d'injection d'ADN nu directement dans le muscle strié d'une souris permet une expression efficace et pendant plusieurs mois du transgène par des fibres musculaires, et ce quel que soit le transgène utilisé [5]. Toutefois, la technique d'injection d'ADN nu souffre également de nombreux inconvénients. En premier lieu, elle possède une faible efficacité de transfection, dans le muscle par exemple, celle-ci est généralement de 1 à 5% des fibres musculaires totales [5]. D'autre part, les cellules transfectées sont limitées aux cellules les plus proches du site d'injection d'ADN nu. Malgré les résultats positifs de transfert de gènes observés dans la peau ou le muscle, les niveaux d'expression du transgène reste faible pour produire un effet thérapeutique, par contre cette expression reste suffisante pour des applications vaccinales [6]. D'autres études ont également démontré l'expression de transgène après injection directe d'ADN nu dans de nombreux organes ou tissus: la peau [7], les articulations [8], le cœur [9], le cerveau [10], la thyroïde [11], le foie [12]…

L'ADN nu injecté est capable d'exprimer de façon suffisante une protéine antigénique permettant la réaction immunitaire. C'est sur cette capacité que repose le principe de la vaccination. Pourtant l'ADN nu, en tant que molécule, ne provoque pas de réponse immunitaire

spécifique. En fait, c'est la présence sur les plasmides de séquences bactériennes riches en motif CpG non méthylés qui favorise *in vivo* les réponses inflammatoires et immunitaires [13]. Le vaccin d'ADN nu est en phase d'essai clinique dans le cadre de différentes pathologies ou maladies tels que le sida, la malaria, l'hépatite B, ainsi que différents cancers [14]. On note ainsi différents essais cliniques de phase I-II et même III [15] par injection directe d'ADN nu ou par culture cellulaire *ex vivo* [16] dans les traitements des cancers. Très récemment au Brésil, un essai clinique de phase I-II a été réalisé par injection d'un ADN nu codant pour le VIH de type 1 dans le but de prévenir les risque infectieux [17]. Une récente étude prouve que le tatouage constitue le moyen le plus efficace pour administrer les nouveaux vaccins à ADN, dont l'emploi était limité en raison de la mauvaise protection qu'ils assuraient quand ils étaient injectés dans les muscles [18].

Bien que l'injection d'ADN nu donne des résultats très encourageants dans le transfert de gène au niveau de la peau ou du muscle, le problème majeur est la dégradation de l'ADN plasmidique nu par voie systémique (administration par voie intraveineuse). Il est très rapidement dégradé par les enzymes et a donc une demi-vie plasmatique très courte. C'est dans le but d'augmenter l'efficacité de transfection (*in vitro* ou *in vivo*) que l'administration d'ADN nu est aidée par des techniques physiques.

En conclusion, l'ADN nu plasmidique peut être utilisé dans les traitements par thérapie génique en injection intramusculaire, mais ses applications restent très restreintes. Dans le but d'améliorer le transfert de gènes, des vecteurs viraux et non-viraux ont été développés.

2.2 LES VECTEURS VIRAUX

Les virus représentent les vecteurs naturels les plus évolués pour le transfert d'une information génétique étrangère dans une cellule. Ce sont des outils efficaces pour la thérapie génique en termes de pénétration intracellulaire et éventuellement de persistance du matériel génétique. Ce sont donc naturellement les premiers vecteurs à avoir été utilisés. Actuellement, les vecteurs viraux sont utilisés environ dans ¾ des protocoles. D'ailleurs, de nombreux virus ont fait l'objet d'adaptation en vecteurs : les plus utilisés sont notamment les rétrovirus, les adénovirus et les virus adénovirus-associés (AAV).

Le cycle viral naturel se distingue en deux phases, la phase d'infection et ensuite la phase de réplication. L'infection consiste en l'introduction du génome viral dans la cellule. L'expression des gènes viraux aboutit dans un second temps à la formation de nouvelles particules virales, c'est la phase de réplication. La plupart des protocoles de thérapie génique ont fait appel à ce genre de vecteur, qui permet d'obtenir une transfection facile et efficace.

Cependant, les virus sauvages ne peuvent pas être utilisés directement pour les expériences de thérapie génique. En fait, la plupart d'entres eux sont pathogènes et dangereux pour l'homme. Donc afin de devenir un vecteur, le virus est doit être modifié par génie génétique.

Le transfert de gènes par des vecteurs viraux se fait de la façon suivante : les virus sont rendus inaptes à la réplication par délétion des séquences responsables de virulence et de réplication. La cassette d'expression contenant un promoteur et le gène d'intérêt est insérée au niveau de ces délétions (la taille maximale de la cassette d'expression dépend du virus utilisé). Toutefois, le virus conserve les nombreuses structures qui lui permettent d'infecter une cellule (protéines de l'enveloppe, protéine fusogène, etc…). Il permet donc la production de la protéine d'intérêt thérapeutique, mais sans production de particules virales.

Les vecteurs viraux sont classés en deux grands groupes : ceux qui intègrent leur patrimoine génétique à l'ADN de la cellule hôte (lentivirus et rétrovirus) et ceux qui ne l'intègrent pas (virus adénoviraux, adénoviraux-associés et herpétiques). Les différents types de vecteurs viraux utilisés sont représentés dans le *tableau n°1*.

	Rétrovirus	**Lentivirus**	**Adénovirus**	**AAV**	**HSV**
Type de virus	ARN	ARN	ADNdb	ADNsb	ADNdb
Infection des cellules quiescentes	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
Production à haut titre	+	++	++++	+	+++
Intégration	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Capacité	≤ 8kb	≤ 8kb	≤ 8kb	≤ 5kb	≤ 40kb
Stabilité	++	++	+	++	++
Potentiel inflammatoire	Faible	Faible	Fort	Faible	Fort
Avantages	Thérapie *ex vivo*, faible immunogénicité, expression à long terme	Infection des cellules quiescentes, expression à long termes	Efficacité de transfection, tropisme naturel pour les voies aériennes, production à haut titre	Large tropisme, non inflammatoire, non pathogène	Large capacité d'insert, fort tropisme pour les neurones
Limitations	Faible efficacité de transfection *in vivo*, problème de production, insertion mutationnelle	Pathogène, problème de production, insertion mutationnelle	Immunogène, inflammatoire (capside), stabilité moyenne	Faible capacité d'insert, problème de production, effet cytopathique	Expression transitoire dans les cellules (autres que neurones), inflammatoire, immunogène

Tableau 1 : Les différents vecteurs viraux [19, 20].

2.2.1 LES RÉTROVIRUS

Les rétrovirus ont été les premiers virus utilisés dans le transfert de gène à visée thérapeutique. Ce sont des virus de la famille des *retroviridae,* disposant d'un fort pouvoir oncogène. Ils sont dotés d'une enveloppe, contenant deux molécules linéaires d'ARN positif simple brin. Ils possèdent une enzyme spécifique, la transcriptase reverse (TR), qui permet la

conversion de l'ARN en un ADN proviral. Le génome des rétrovirus contient deux régions appelées *Long Terminal Repeat* (LTR) séparées par les gènes *gag*, *pol*, et *env* codant respectivement pour les protéines structurales, les polymérases et les intégrases ainsi que les glycoprotéines de surface [21].

Lorsque le rétrovirus pénètre dans la cellule, l'ADN viral est transporté dans le noyau de la cellule hôte, puis s'insère de façon aléatoire dans le génome (*Figure 2*). En effet, l'intégration aléatoire du génome viral peut engendrer une mutagenèse conduisant à une anomalie du cycle cellulaire, et activer des oncogènes comme ce fut le cas lors du traitement des 'enfants bulles', provoquant chez ces patients des leucémies secondaires.

Pour que l'incorporation chromosomique soit effective, le rétrovirus exige que la cellule hôte se réplique, ce qui constitue un désavantage important. Or, certaines cellules comme les myocytes cardiaques et les cellules vasculaires sont peu aptes à proliférer.

Ils possèdent aussi comme inconvénient une faible capacité d'incorporation d'un exogène (≤ 8 kb) et un manque de spécificité cellulaire. En effet, les protéines de l'enveloppe sont capables de se lier à de nombreux récepteurs portés par différents types de cellules. Les rétrovirus sont rapidement inactivés par le système du complément lorsqu'ils sont injectés par voie systémique. C'est pour cela que les essais menés *in vivo* ont montré une efficacité de transfection réduite. A l'opposé, leur utilisation *ex vivo* permet le transfert de gènes dans des cellules tels que lymphocytes et cellules souches hématopoïétiques sur lesquelles une grande expérience clinique a été acquise.

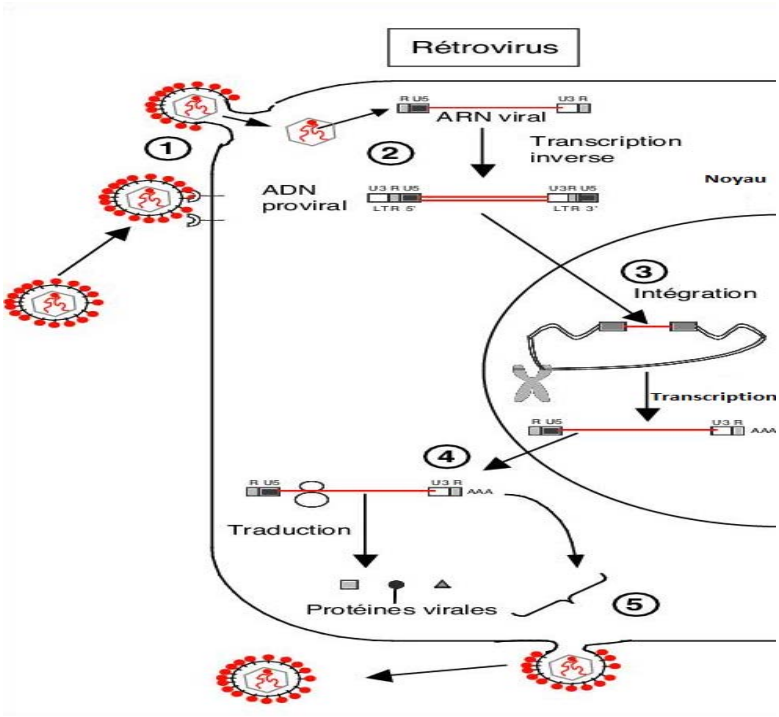


Figure 2 : Représentation schématique du cycle d'infection des rétrovirus. 1) Les rétrovirus pénètrent dans la cellule.). L'ARN viral est converti en ADN double brin par la transcriptase inverse virale présente dans la particule virale. 3) Intégration du provirus dans l'ADN nucléaire de la cellule hôte sous l'effet d'une intégrase. 4) Le provirus intégré est transcrit en ARNm. 5) Les cellules infectées assemblent et relarguent par bourgeonnement des particules virales infectieuses.

Parmi les rétrovirus, les lentivirus sont particulièrement prometteurs. Ils ont l'avantage de s'intégrer dans le génome des cellules qu'elles soient en prolifération ou non. En effet, contrairement aux autres rétrovirus, les lentivirus possèdent un signal de localisation nucléaire permettant à l'ADN proviral de pénétrer dans le noyau en l'absence de mitose (*Figure 3*). Ce sont des virus à ARN monocaténaire dérivés des virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le génome des lentivirus, possède en plus des gènes de base des rétrovirus, deux gènes de régulation, *tat* et *rev* qui sont essentiels pour l'expression du génome ainsi que des gènes accessoires. Lorsque la cellule est infectée, l'ARN du vecteur qui contient le gène d'intérêt est transcrit en ADN à l'aide de la reverse transcriptase. L'ADN ainsi transcrit forme un complexe de préintégration avec la protéine accessoire Vrp, l'enzyme intégrase et la protéine codée par

le gène *gag* du virus. Ce complexe comporte un signal de localisation nucléaire qui lui permet de passer l'enveloppe nucléaire. Dans le noyau, l'ADN est inséré dans le génome de l'hôte à l'aide de l'intégrase [22].

Des études ont démontré l'efficacité de ces vecteurs pour l'application directe *in vivo* dans différents organes (cerveau, muscle, foie, poumon) [23-25], mais le risque de mutagenèse insertionnelle subsiste [21].

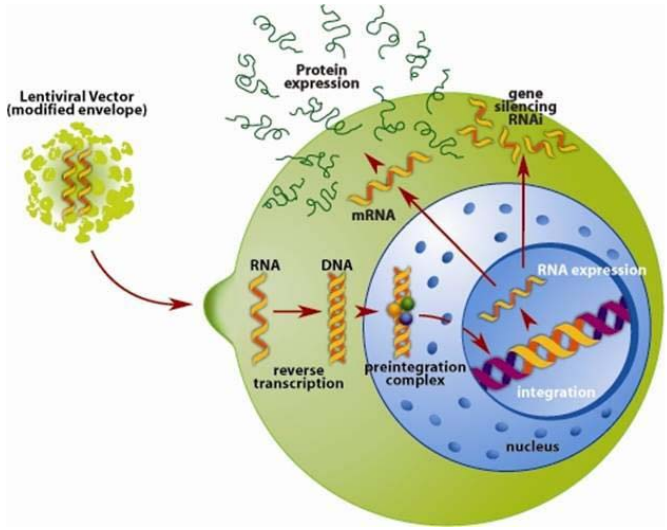


Figure 3 : Principe du transfert de gènes par un lentivirus.
Source : www.lentigen.com/technology/vectors.

2.2.2 LES ADÉNOVIRUS

Les adénovirus sont des virus provenant de la famille des *adenoviridae*. Ce sont des virus à ADN linéaire double brin contenant un génome de 36 kb limité par des séquences répétées inversées (*inverted terminal repeats, ITR*). Ils sont particulièrement adaptés aux protocoles de thérapie génique, car ils se répliquent de façon très efficace et sont faciles à produire. Ils sont responsables chez l'homme d'infections bénignes (conjonctivites, gastro-entérites…) et sont peu pathogènes. Le cycle d'infection de l'adénovirus se divise en deux phases : une phase plus précoce qui concerne l'entrée du virus dans la cellule hôte, le passage du génome viral au noyau cellulaire suivi par la transcription des gènes précoces et une phase

plus tardive [26]. Après fixation et pénétration par endocytose dans la cellule, le génome viral migre vers le noyau mais ne s'intègre pas au patrimoine génétique de l'hôte (*Figure 4*), ne provoquant qu'une expression transitoire du gène thérapeutique (ce qui est à la fois un avantage et un inconvénient), mais évitant les risques de mutagenèse. Par ailleurs, ces virus sont capables d'infecter de nombreux types de cellules quiescentes ou en division et possèdent un tropisme naturel pour les voies aériennes supérieures [27].

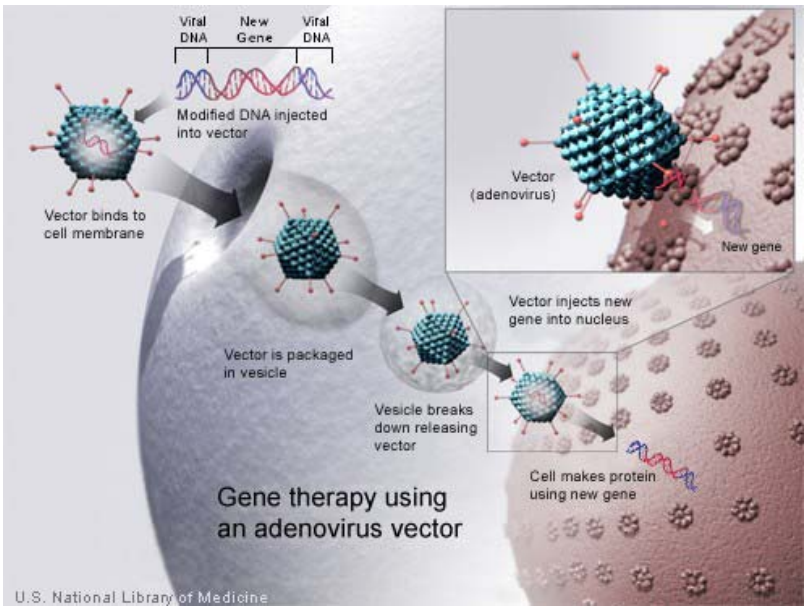


Figure 4 : Principe du transfert de gène par adénovirus.
Source: ghr.nlm.nih.gov/.../illustrations/therapyvector

L'inconvénient majeur à l'utilisation de ces vecteurs est lié à la forte réaction immunogène de l'hôte (due à l'expression résiduelle de protéines virales), qui développe des anticorps anti-adénovirus empêchant ainsi une administration répétée de ces vecteurs. L'autre limitation réside dans la faible capacité d'incorporation d'un exogène (≤ 8kb).

Depuis peu, des nouveaux adénovirus ont été développés (Ad.gutless). Ce sont des adénovirus qui ont été dépourvus de toutes les séquences génétiques virales, ce qui a permis un gain de place. Ces virus possèdent donc une capacité d'incorporation allant jusqu'à 35kb. Mais aussi, la

réponse immunitaire est fortement réduite *in vivo*. Etant dépourvus de toute séquence virale, les Adénovirus « gutless » nécessitent l'apport des protéines virales par un virus « helper ». Le niveau de contamination des préparations finales par des virus « helper » est encore 0,1 à 1% trop élevé pour être utilisées en clinique [28, 29]. En Chine, l'adénovirus modifié H 101 a reçu l'autorisation de la Chinese State Food and Drug Administration (SFDA) pour être utilisé en combinaison avec la chimiothérapie comme traitement clinique antitumorale [29].

2.2.3 LES VIRUS ASSOCIÉS AUX ADÉNOVIRUS (AAV)

Les vecteurs de virus associés aux adénovirus (AAV pour Adeno Associated Virus) proviennent de la famille des parvovirus humains non enveloppés et avec une capside. Ce sont des virus qui nécessitent un autre virus (adénovirus ou HSV) pour accomplir leur cycle de réplication. Ils contiennent deux gènes pouvant produire plusieurs polypeptides : *rep* pour la réplication virale et *cap* pour l'encapsidation. Ces deux gènes sont entourés de régions *ITR (inverted terminal repeat)*. Ce sont des virus non pathogènes pour l'homme.

L'avantage de ces virus est leur capacité à intégrer leur patrimoine génétique dans la cellule hôte, permettant une expression prolongée du gène. Par ailleurs, ils sont capables d'infecter à la fois des cellules en division et quiescentes.

De plus ils possèdent une bonne efficacité de transfection *in vivo,* et peuvent transfecter différents organes (muscles, poumons, foie..). En effet, les essais *in vivo* concernant les traitements de la mucoviscidose, l'hémophilie et la dystrophie musculaire ont montré une expression du transgène.

Bien que depuis des années les protocoles de production et de purification ont été améliorés [21], de tels vecteurs sont difficilement produits en quantités suffisante pour constituer des

lots cliniques. Ils comportent aussi un inconvénient majeur, leur capacité de stockage du matériel génétique exogène étant limitée à 5kb.

2.2.4 LES HERPES VIRUS SIMPLEX (HSV)

Le virus Herpes Simplex de type 1 (HSV-1) est le virus herpes le plus utilisé en thérapie génique. C'est un virus d'ADN linéaire bicaténaire, qui infecte les cellules neuronales quiescentes. Pourtant, il reste peu pathogène pour l'homme car présent dans 80% de la population. Le virus fusionne avec la membrane d'un neurone puis est transporté dans le noyau. En effet, son neurotropisme est particulièrement attractif : les vecteurs HSV offrent un espoir de transfert de gènes dans les maladies neuronales telles que les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer.

Les amplicons sont des vecteurs dérivés du virus HSV-1, identiques au virus sauvage HSV-1 structuralement et immunologiquement, qui comportent à la place du génome viral un plasmide appelé amplicon. Ils possèdent de nombreux avantages tels que : la capacité d'intégrer un transgène d'environ 150kb ; de former des copies multiples du transgène dans une cellule ; la capacité d'infecter différents types cellulaires dont les cellules dendritiques ; ont une toxicité limitée due à la faible présence de séquence génomique viral [30]. Les récentes études précliniques sur les vecteurs HSV-1, ont permis de concevoir des vaccins pour les traitements de différentes pathologies. Mais des efforts restent encore à fournir pour produire les vaccins en quantité suffisante pour les phases cliniques [31].

En conclusion, les vecteurs viraux possèdent de nombreux avantages pour le transfert de gènes et leur succès dans les protocoles de thérapie génique repose sur leur important potentiel de transfection in vivo. Cependant, ils souffrent de sévères inconvénients :

- l'intégration d'un transgène de grande taille est souvent très difficile,
- certains virus engendrent des réactions immunitaires,
- d'autres peuvent poser des problèmes de toxicité ou redevenir pathogènes après mutagenèse ou recombinaison avec un virus parent infectieux ;
- enfin, leur manipulation et la production de lots cliniques sont compliquées et coûteuses.

Ces problèmes ont incité les chercheurs à développer des vecteurs non viraux de transfert de gènes, plus sûrs.

2.3 LES VECTEURS NON VIRAUX

Les premiers vecteurs non-viraux ont vu le jour dans les années 80. Actuellement, l'utilisation de ces vecteurs représente environ 10% des essais de thérapie génique.

Le développement des vecteurs synthétiques répond à certaines limitations des vecteurs viraux (*Tableau 2*).

Vecteurs	Avantages	Inconvénients
Viraux	Transfert d'ADN efficace ADN de taille variable	Immunogène Intégration mutagène Possibilité de recombinaison Pas facile à produire et à stocker
Non-viraux	Non immunogènes Plus sûrs Production et stockage facile	Transfert peu efficaces Intégration au génome faible et aléatoire

Tableau 2 : Avantages/ Inconvénients des vecteurs viraux et non-viraux.

Premièrement, ils présentent une moindre toxicité et n'entraînent pas l'activation d'une réaction immunitaire. Deuxièmement, ils présentent des avantages sur le plan technique puisque la taille du matériel génétique utilisé n'est pas limitée, leur production est

généralement simple et enfin ces techniques sont en général très reproductibles. Tout comme les vecteurs viraux, ils doivent aussi répondre à une utilisation future *in vivo* et plus particulièrement chez l'homme.

De manière générale, une condensation de l'ADN dans des assemblages stables est effectuée par un simple effet de coopérativité grâce à des matériaux polycationiques. Les vecteurs synthétiques sont le plus souvent composés de polymères cationiques, leur charge étant conférée par des groupements amine, qui leur permettent d'interagir avec les groupements phosphate de l'ADN par des forces électrostatiques. Ces interactions vont mener à la condensation de l'ADN dans des structures de taille et de charge variables permettant la protection de celui-ci vis à vis des nucléases en limitant l'accès de ces dernières à l'ADN. Les caractéristiques physico-chimiques de ces structures dépendent de la nature du polymère, de sa masse moléculaire et de sa proportion par rapport à l'ADN. La stabilité de ces complexes est dictée par la nature du polymère. En général ceux-ci ont tendance à s'agréger avec le temps ou lorsque leur concentration augmente. Les complexes sont généralement préparés avec un excès de polymère ce qui aboutit à une particule de charge positive. La charge de ces complexes permet l'interaction avec les molécules anioniques de la surface cellulaire, notamment les protéoglycanes [32], et leur endocytose.

Plus récemment, l'utilisation de nanoparticules ou de microparticules permet l'encapsulation de l'ADN à l'intérieur d'une matrice ou l'adsorption de celui-ci en surface. Ceci leur confère une relative protection vis-à-vis des DNAses [33, 34].

2.3.1 LES LIPOPLEXES

Depuis leur première utilisation, les formulations à base de lipides cationiques n'ont pas cessé de se multiplier pour devenir actuellement l'alternative la plus étudiée à l'emploi des vecteurs viraux. Les lipides cationiques forment avec l'ADN des ensembles supramoléculaires appelés lipoplexes par interactions électrostatiques qui permettent un transfert de gène très efficace.

Les lipides cationiques amphiphiles sont constitués de 3 domaines : une tête cationique permettant la liaison à l'ADN, une ou plusieurs chaînes hydrophobes, et un espaceur séparant ces deux éléments (*Figure 5*). En solution aqueuse, les chaînes hydrophobes s'associent entre elles pour former des particules (micelles ou liposomes). L'organisation la plus stable de ces molécules amphiphiles est celle qui permet de minimiser les interactions entre les composantes hydrophobes et les molécules d'eau.

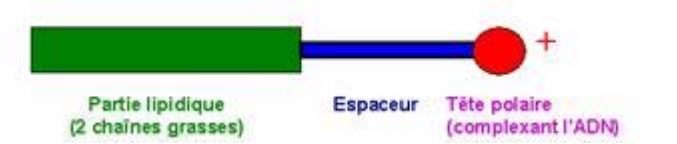


Figure 5 : Structure caractéristique des lipides cationiques utilisés en transfection [35].

De nombreux kits de transfection commerciaux, se basant sur l'utilisation de ce type de complexe vecteur, sont disponibles aujourd'hui (lipofectamine®, fugene 6®…).

Le premier lipide cationique décrit est le bromure de 2,3-Dioléoylloxypropyl-1-trimethyl ammonium bromide (DOTMA) (Lipofectamine®) [36]. Dans le but d'obtenir une meilleure biodégradabilité et de réduire la toxicité du DOTMA, la liaison éther a été remplacée par une liaison ester pour obtenir le 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) [37]. Plus récemment, des lipides cationiques sont complexés avec des siRNA et testés sur des cellules mammaires [38]. Il s'agit notamment d'analogues de structure 1,2-Dioleoyl-3-

trimethylammonium-propane DOTAP, dioctadecylamido-glycylspermine (DOGS ou transfectam), *N*-méthyl-4-(dioleyl)méthylpyridinium (SAINT-2), de lipides cationiques contenant du cholestérol, ou des lipopolyamines dont la tête cationique est généralement dérivée de la spermine (*Figure 6*). L'ADN formulé avec les lipides cationiques, comme le DOTMA, et un phospholipide neutre (le plus couramment la dioléoylphosphatidyléthanolamine ou DOPE), forme des lipoplexes capables de transfecter des cellules avec une grande efficacité *in vitro* [39], et *in vivo* [40]. Depuis la mise en évidence de l'efficacité transfectante des particules composées d'ADN et DOTMA/DOPE, une grande variété de lipides cationiques a été synthétisée et testée, avec pour objectif d'augmenter l'efficacité de transfection en l'absence comme en présence de sérum, de réduire la cytotoxicité des formulations et d'améliorer la biodisponibilité des particules ADN-lipides.

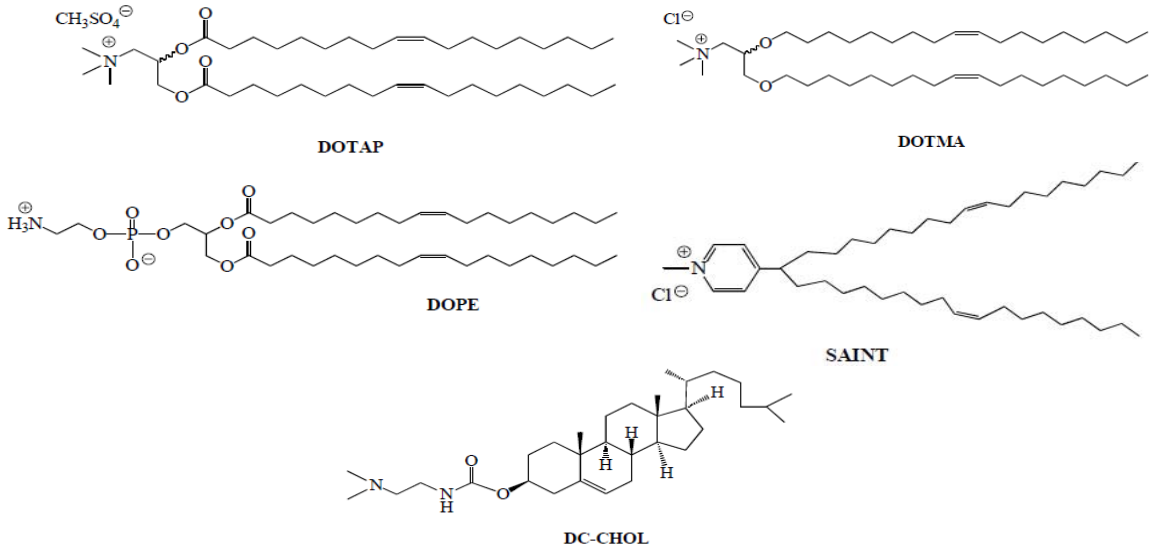


Figure 6 : Structure chimique des principaux lipides cationiques utilisés dans le transfert de gènes.

Différents types d'auto-assemblage sont possibles selon la concentration en lipides, la température mais aussi selon la forme géométrique des molécules considérées [41] (*Figure 7*).

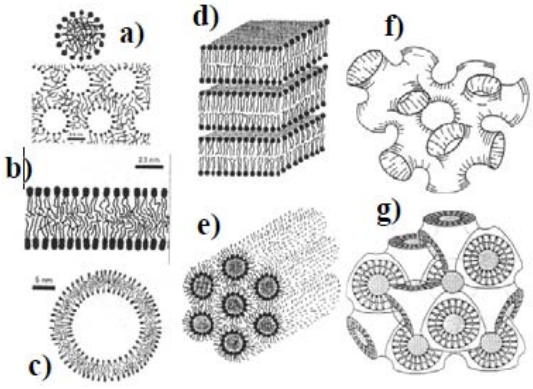


Figure 7 : Exemples d'assemblages possibles pour les molécules amphiphiles dans un solvant aqueux : a)micelles et micelles inverses, b) bicouche, c) liposomes, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse (arrangement de micelles cylindriques inverses), f) phase éponge, g) phase cubique directe bicontinue [42].

Les liposomes (*Figure 7c*) sont des structures les plus utilisées parmi celles présentées en Figure 7. Ils peuvent être classés selon leur taille et leur nombre de bicouches. On distingue les liposomes multilamellaires (MLV), les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV), les liposomes unilamellaires de grande taille (LUV) et les liposomes géants (GUV). La méthode la plus simple pour préparer des liposomes consiste à évaporer le solvant organique dans lequel sont dissout les lipides, puis à les remettre en suspension dans un solvant aqueux [43]. En plus, comme la composition lipidique des liposomes, les bicouches peuvent être changées, et les formulations peuvent être personnalisées pour obtenir des caractéristiques souhaitées (taille, charge de surface, morphologie….).

Bien que plusieurs tentatives ont été faites pour utiliser des liposomes neutres ou chargés négativement pour le transfert de gènes [44], l'efficacité limitée de l'encapsulation de l'ADN plasmidique et par conséquent les faibles niveaux de transfection ont encouragé les chercheurs à se concentrer sur des liposomes cationiques, capables de complexer et de condenser l'ADN.

Les lipides cationiques ont déjà été utilisés pour transfecter des acides nucléiques dans différents essais de transfert de gènes *in vivo* [45], en particulier dans le traitement des cancers [46-48], et de la fibrose cystique (CF) [49, 50], mais aussi à des fins anti-inflammatoires [51] et pour la prévention des infections virales [52].

Il existe des lipides dit « helper » (DOPE, cholestérol…) permettant d'améliorer la capacité des liposomes cationiques à transfecter des cellules. Leur rôle de « helper » est de faciliter la libération cytosolique en déstabilisant la membrane endosomale. Le choix des lipides « helper » ont un impact majeur sur la structure et l'activité de liposomes. Des études *in vitro* ont montré que des liposomes composés d'un mélange équimolaire de DOPE et de lipides cationiques peuvent avoir des niveaux supérieurs de transfection en comparaison de ceux ne contenant que des lipides cationiques seuls [53]. Le cholestérol peut être considéré comme un lipide « helper ». D'ailleurs, les lipoplexes contenant du cholestérol ont montré des taux d'activité biologique supérieur aux lipoplexes formulés avec le lipide cationique DOPE, lorsqu'ils sont utilisés *in vivo* [54].

2.3.2 LES POLYPLEXES À BASE DE POLYMÈRES CATIONIQUES

Un grand nombre de polymères de synthèse compactent efficacement l'ADN, et leur utilisation se base sur la simple observation d'évènements naturels : dans les cellules eucaryotes, la condensation de l'ADN chromosomique est obtenue par l'utilisation de protéines riches en lysine et arginine : les histones. De même, dans les spermatozoïdes, c'est une autre protéine riche en arginine, la protamine, qui permet une compaction maximale du matériel génétique.

Les polymères cationiques, tels la poly(L-lysine) (PLL), la protamine, la polyéthylèneimine (PEI), ou encore les dendrimères cationiques, s'associent à l'ADN par des interactions

électrostatiques multiples engendrant un processus de coopérativité, ce qui génère des particules appelées polyplexes.

2.3.2.1 LE CHITOSANE

Le chitosane est un polymère polysaccharidique d'origine naturelle obtenu par désacétylation alcaline de la chitine extraite de l'exosquelette des crustacés et des insectes. Biodégradable, et non toxique il possède une faible immunogénicité, soit trois propriétés primordiales [55]. Il est constitué de deux sous-unités la D-glucosamine et la N-acetyl-D-glucosamine liées par une liaison glucosidique. (*Figure 8*).

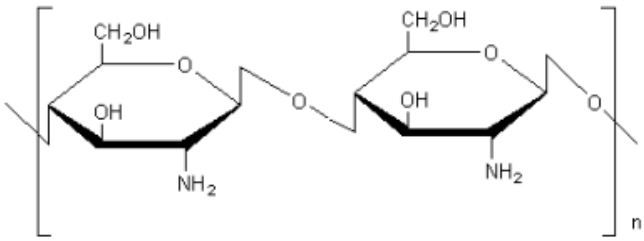


Figure 8 : Structure d'une unité polymérique du chitosane.

Lors d'études d'adhésion, il a été prouvé par Lehr et coll. (cité dans [56]) que le chitosane est un polymère mucoadhésif. Cette application est très intéressante à la transfection gastro-intestinal de cellules épithéliales ou immunitaires.

Le chitosane peut être caractérisé par sa masse molaire mais aussi par son degré d'acétylation qui correspond au pourcentage de fonctions N-acétyle. Comme il a été décrit dans de nombreuses revues [55, 57], l'efficacité de transfection des complexes chitosane ADN dépendent de nombreux facteurs incluant, le poids moléculaire, le degré de déacétylation, le ratio N/P…. Le poids moléculaire et le degré de désacétylation influence la taille et le potentiel

de surface des complexes chitosane/ADN. Ainsi les complexes ont une taille variant de 150 à 600 nm [58], 155 à 181 nm pour des chitosanes de 213 à 48 kDa, au delà pour des chitosanes de poids moléculaires plus faibles. Le même type d'évolution est observé en fonction du taux de désacetylation pour le potentiel de surface des complexes. Mais aucun effet sur la condensation de l'ADN n'est observé. A partir d'un rapport N/P=6, l'ADN est totalement complexé mais les complexes sont peu stables dans le temps et on assiste à une libération de l'ADN en quelques heures dans du PBS sauf si les complexes ont été réticulés au préalable [55]. Ces complexes présentent une bonne résistance vis à vis des nucléases. Mais dans ce cas également ceci est corrélé au poids moléculaire du chitosane. Il existe une corrélation entre l'endocytose des complexes, le taux de transfection, le rapport N/P et le potentiel de surface du complexe.

2.3.2.2 LES PEPTIDES

Un certain nombre de peptides (CPP, *Cell Penetrating Peptide*) ou petites protéines (PTD, *Protein Transduction Domain*), ayant la propriété de traverser la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes ont été utilisés pour vectoriser des macromolécules dont des oligonucléotides.

Les CPPs sont des peptides de 7 à 30 résidus, généralement divisés en deux classes : les peptides en hélice alpha riches en lysine et les peptides riches en arginine. Certaines de ces séquences dérivent de protéines naturelles telles que des protéines de surface de virus et bactéries (*Tableau 3*).

Agents de translocation	Séquence d'acides aminés	Origines
Pénétratine	RQIKIWFQNRRMKWKK	Antennapedia
Tat (48-60)	GRKKRRQRRRPPQC	HIV-1
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Galanine et Mastoparan
Peptide amphiphile	KALKLALKALKAALKLA	Synthèse
Arg9	RRRRRRRRR	Synthèse

Tableau 3 : Exemples d'agents peptidiques.

Aujourd'hui il n'existe aucun consensus quant au processus d'entrée de ces CPPs dans le cytosol et le noyau. Les CPPs pourraient entrer dans la cellule par des mécanismes passifs mais également par endocytose ou macropinocytose [59]. Ces peptides permettent le transport de petites molécules mais également de nanoparticules et le type des molécules associées influence la voie d'entrée dans la cellule.

Les premiers CPPs utilisés en transfection proviennent de protéines virales comme l'hémmaglutinine HA2 du virus de l'influenza, Tat (transactivateur de transcription) du virus de l'immuno déficience acquise, ou VP22 du virus herpes simplex de type 1. La plupart de ces peptides ne peuvent pas complexer l'ADN et sont donc en général associés à un autre type de vecteur de transfection, un lipide cationique ou du PEI [60]. Très peu d'études sur la transfection des plasmides avec des CPPs ont été rapportées.

Aujourd'hui, on développe une nouvelle classe permettant la complexation de l'ADN et la translocation au sein de la cellule. Le premier peptide de ce type décrit est KALA (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA). Il complexe efficacement l'ADN par ses résidus lysine et arginine, et peut interagir avec les membranes. Jacobs et al ont synthétisé des vecteurs dérivés de JTS1 (GLFEALLELLESLWELLLEA) en substituant tous les résidus acides glutamiques par des résidus lysine ou arginine. Ces peptides ppTG1 et ppTG20 sont efficaces pour la transfection [61]. Les résidus lysine sont répartis du même coté de l'hélice alpha, ce qui

confère au peptide un caractère amphipatique. Comme la distance entre deux groupements NH_3^+ est de 7.11 Å, comparable à la distance entre deux groupements phosphate dans l'ADN (6.55 Å), le peptide peut interagir avec l'ADN sans que cela n'affecte sa structure secondaire et donc son activité fusogénique. Ceci n'est pas le cas pour d'autres peptides comme KALA qui s'assemble en plusieurs couches. De plus ce sont les premiers peptides décrits comme efficaces pour la transfection *in vivo*. Après injection intravasculaire, les auteurs observent une expression dans les poumons. Leur efficacité est pourtant pour le moment 10 fois inférieure à celle des formulations de DOTAP et cholestérol, mais également 40 fois inférieure au PEI dans les mêmes conditions. Ces peptides existent sous forme de dendrimères qui présentent une capacité de transfection accrue et comparable à celle de vecteurs synthétiques comme la lipofectamine® [62, 63].

2.3.2.3 LA POLY(L-LYSINE) PLL

De nombreux auteurs se sont intéressés au rôle compactant que peuvent avoir des polymères d'acides aminés chargés positivement. La poly(L-lysine) (PLL) est un des premiers polymères cationiques utilisés pour le transfert de gène [64]. C'est un polypeptide linéaire dont la sous-unité est la lysine (*Figure 9*). C'est un polymère dégradable, ce qui le rend intéressant pour une utilisation *in vivo*. La PLL est caractérisée en général par son degré de polymérisation ou son poids moléculaire.

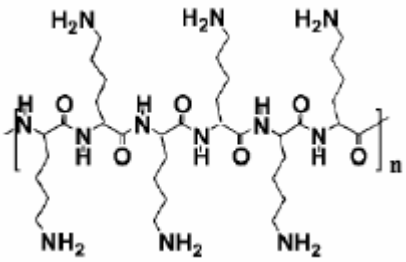


Figure 9 : Structure chimique de la poly-L-lysine.

En présence d'ADN, la PLL peut former des complexes et pénétrer dans les cellules. La condensation de l'ADN ainsi que l'efficacité de transfection augmente avec le poids moléculaire de la PLL, mais dans ce cas la cytotoxicité de ces complexes augmente également [65]. Ce polymère ne présente en revanche qu'un faible pouvoir tampon ne permettant pas une sortie efficace des endosomes. Ainsi l'utilisation d'agents endosomolytiques comme la chloroquine [66] ou des peptides fusogéniques [67] sont souvent nécessaires pour obtenir une transfection plus efficace. Sans modification, les complexes de PLL/ADN ne sont pas de bons candidats pour la transfection *in vivo*. En effet les complexes s'agrègent lorsque le taux de sel atteint un seuil physiologique et la fixation des protéines sériques entraîne leur élimination rapide de la circulation. Néanmoins différentes modifications permettent de contourner les désavantages de ce polymère. La solubilité peut être augmentée par le greffage de PEG, mais contribue aussi à résister à la réponse immunitaire en prolongeant la demi-vie du complexe dans le sang [68]

De plus, les PLL amphiphiles présentent une plus faible toxicité et leur capacité de transfection est 30 fois supérieure aux PLL classiques. La stabilité des PLL glycosylées est également plus importante comparée aux PLL classiques et leur toxicité est moindre [69]. En effet, l'adjonction de résidus histidine ou de structures imidazole permet d'augmenter l'efficacité de transfection en favorisant l'échappement des endosomes du fait de l'activité de pompe à protons de ces résidus [70, 71]. En s'inspirant de ce polymère, de nombreuses structures peptidiques ont été utilisées tels que la polyornithine, et la polyarginine. Ces différents composés sont moins toxiques, et plus efficaces pour le transfert de gènes [71, 72].

2.3.2.4 LA POLY(ÉTHYLÈNIMINE)

La polyéthylènimine (PEI) est un composé polycationique connu depuis plus de cinquante ans et qui était préalablement utilisé pour la purification d'eau potable, l'extraction de minerais, dans les shampooings, etc.

Ce polymère est une polyamine qui passe de 20 à 45% de protonation entre pH 7 et pH 5 respectivement. La PEI est un vecteur doté d'un pouvoir endosomolytique grâce à son effet « éponge à protons ». Cette propriété lui permet de libérer le polyplexe dans le cytoplasme sans que l'ADN soit dégradé par les enzymes lysosomiales et fait de lui un bon vecteur non viral pour le transfert de gènes.

Différents dérivés du PEI sont disponibles sur le marché (PEI linéaire de 22 ou 25kDa, PEI branchés, PEI couplé à des résidus osidiques biotinylés ou à un fluorophore). Les molécules de PEI peuvent prendre des formes linéaires ou réticulées (branchée) (*Figure 10*). La PEI linéaire et de haut poids moléculaire (10kDa) semble donner des meilleurs taux de transfection *in vitro* et *in vivo* [73-75]. Il est utilisé comme vecteur de transfection depuis 1995 *in vitro* et *in vivo* [76-78]. Il existe dans le commerce sous formes de réactifs de transfection utilisant le PEI linéaire (Exgen500®, jetPEI®). Les PEI existent sous une grande diversité de poids moléculaire allant de 1000 Da à $1{,}6.10^3$ kDa mais les PEI utilisés dans le cadre de la transfection ont généralement un poids moléculaire compris entre 5 et 25 kDa. En effet, des faibles poids moléculaires présentent une plus faible cytotoxicité [79]. De plus, des études visant à tester des PEI de structure et de poids moléculaires différents n'ont fait état d'aucune cytotoxicité majeure aux concentrations de PEI utilisées pour la transfection *in vitro* et *in vivo*.

L'efficacité de transfert décrit dans la littérature est variable d'une lignée cellulaire à l'autre mais dans tous les cas, les niveaux d'expression sont généralement plus faibles que ceux

obtenus avec les vecteurs viraux. Le rendement du vecteur dépendant de plusieurs paramètres, il faut en tenir compte afin d'obtenir une efficacité optimale.

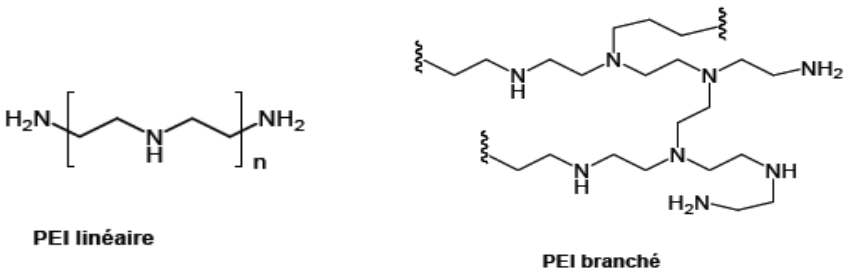


Figure 10 : Formule chimique de PEI branché et linéaire.

Les complexes PEI/ADN ont une forme sphérique, globulaire ou en bâtonnet [80]. La complexation se fait principalement par interactions électrostatiques. La taille des polyplexes est variable (50 à 100 nm) et dépend des paramètres extérieurs tels que la nature du milieu de préparation, la nature du PEI, le ratio N/P….

Pour un transfert de gènes efficace, il faut que la charge globale du complexe PEI/ADN soit positive pour favoriser l'interaction avec la membrane cellulaire chargée négativement. Un paramètre essentiel à prendre en charge lors de l'utilisation d'un dérivé du PEI est le ratio des charges N/P qui correspond au rapport du nombre de fonctions amine du PEI (charges positives) sur le nombre de molécules de phosphate de l'ADN (charges négatives). Ce rapport N/P doit être optimisé afin d'obtenir la meilleure efficacité de transfection, pour chaque vecteur et pour chaque type cellulaire [76, 81].

Lors de la complexation, avec des N/P supérieurs à 6 une grande partie du PEI (86%) reste à l'état libre [82]. La purification des complexes mène à la réduction de la cytotoxicité mais également de l'efficacité de transfection car le PEI libre, endocyté en même temps que les complexes, participerait à l'effet tampon menant à la libération des complexes dans le cytoplasme [83]

Il existe également un lien entre la taille des complexes ADN/PEI et l'efficacité de transfert de gène. Il semble que les polyplexes de petite taille (40 nm) soient moins efficaces [84]. Des résultats différents ont été obtenus par Bettinger et coll. (1999) qui sont arrivés à une meilleure transfection avec des complexes ADN/PEI-galactosylé moins volumineux [85]. *In vitro*, les particules PEI/ADN de grande taille (<200 nm) transfectent très efficacement les cellules, quel que soit le rapport de charge utilisé mais poseraient *in vivo* des problèmes de diffusion dans les fluides biologiques et les tissus, restreignant donc considérablement la zone à transfecter. Quant aux particules de petite taille (>100 nm), elles ne sont efficaces en transfection que si elles sont fortement positives. Leur efficacité peut-être augmentée *in vitro* :

- En facilitant le contact des complexes avec les cellules par exemple par centrifugation.
- En réduisant le volume de milieu par puits pendant la transfection.
- En améliorant l'endocytose (couplage avec un ligand pour une reconnaissance des complexes par un récepteur membranaire) [86].
- En optimisant la libération cytoplasmique du gène [87].

Par contre, ces données théoriques ne sont pas forcément transférables aux conditions expérimentales. La nature du milieu dans lequel les complexes ADN/PEI sont préparés détermine la stabilité et la taille des polyplexes. Les milieux de préparation qu'on rencontre le plus souvent sont le glucose 5%, le NaCl 150 mM, et l'eau. Les polyplexes PEI/ADN 22 kDa préparés dans du glucose 5% ont des tailles homogènes comprises entre 30 et 80 nm. Ces même complexes préparés dans une solution saline de NaCl 150 mM deviennent plus volumineux (de l'ordre du micromètre) [88].

Utilisé à un ratio N/P=10, les polyplexes à base de PEI 25 kDa préparés dans une solution de NaCl 150 mM permettent de former des polyplexes de tailles légèrement supérieures (50 à 100 nm), à celles obtenues avec les PEI 22 kDa dans une solution glucosée [89].

In vivo dans le cerveau de souriceaux nouveaux-nés et de souris adultes les complexes formés à partir du PEI 22 kDa, ont montré une bonne efficacité de transfection et une diffusion sans toxicité apparente [88]. Injectés par voie intraveineuse sur des souris au niveau du rein, ces mêmes complexes (N/P=10, 100 µg d'ADN) permettent une plus forte expression du transgène dans différents organes tels que le myocarde, les poumons, le foie, la rate et les reins [74, 90].

Dans un effort visant à améliorer l'efficacité de transfection, des modifications ont été réalisées à la structure du PEI, telle que la PEGylation. Le copolymère PEI-PEG crée à la surface une hydrophilie qui réduit les interactions avec des protéines plasmatiques, donc une protection de l'ADN. D'autres groupes, ont modifié la fonction amine du PEI afin d'améliorer l'efficacité de transfection. Wang et coll (2002), ont montré sur les cellules Jurkat-T une diminution de la toxicité et une augmentation de l'efficacité de transfection avec le cholestérol conjugué au PEI 1000 Da [91].

Les PEI n'ont pas une haute spécificité de ciblage. Ce dernier peut être amélioré en associant au vecteur une molécule (glucose, protéine, lipide) qui sera reconnue de manière spécifique par son récepteur situé au niveau des cellules cibles. Sur une lignée de carcinome du pharynx surexprimant des récepteurs au protéoglycanes, les meilleurs résultats de transfert ont été obtenus avec du PEI linéaire tétraglucosylé [92]. Dans une autre perspective, pour imiter le système de pénétration cellulaire adénoviral, des peptides contenant le motif RGD (séquence CYGGRGDTP), ont été greffés sur le PEI 25kDa via des ponts disulfures. Ces peptides sont reconnus par les intégrines, récepteurs exprimés à la surface des cellules adhérentes [89]. Le conjugué PEI-peptide forme des polyplexes de taille homogène (50 à 100 nm) et permet une efficacité de transfection de 10 à 100 fois supérieure à celle obtenue avec le PEI 25 kDa sur des

cellules exprimant des intégrines (Hela et MRC5). Cependant, pour le transfert de gènes *in vivo* [93], ce système conjugué n'est pas très approprié dans la mesure où il s'agrège facilement lui aussi avec de nombreux composés du sang.

2.3.3 LES CYCLODEXTRINES

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon. Les trois cyclodextrines naturelles les plus courantes se composent de 6, 7 ou 8 unités α-D-glucopyranose en configuration chaise reliées entre elles par des liaisons α-1,4. Elles sont dénommées respectivement α-, β- ou γ-cyclodextrines. Leur structure en trois dimensions apparaît sous la forme d'un cône tronqué à l'extérieur duquel se trouvent les groupements hydroxyles. Elles possèdent une cavité interne apolaire et donc hydrophobe et une surface externe polaire hydrophile (*Figure 11*). Les cyclodextrines possèdent de nombreuses propriétés dont la plus notable est de former des complexes d'inclusions avec de petites molécules hydrophobes. Les cyclodextrines sont biocompatibles et sont approuvées par la FDA en tant qu'agents solubilisants, ou excipients pour certaines drogues car elles protègent des dégradations enzymatique, physique ou chimique. De plus, elles augmentent la perméabilité membranaire de certains médicaments [94].

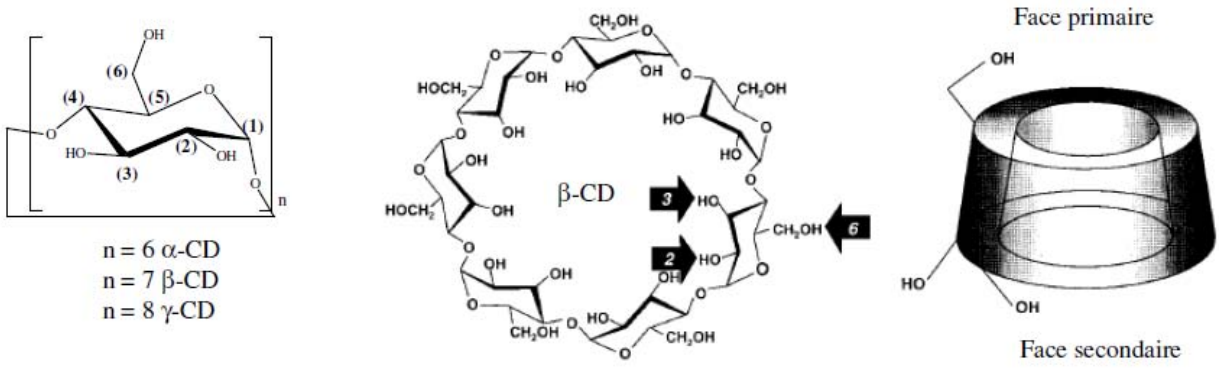


Figure 11: Représentation de la structure chimique des cyclodextrines naturelles [95].

Les CDs ont une faible immunogénicité, présentant de nombreux sites permettant le greffage de fonctions comme des fonctions cationiques capables d'interagir avec l'ADN ou des groupements permettant le ciblage cellulaire.

Les CDs neutres peuvent interagir avec les acides nucléiques et les nucléotides, mais sont incapables de les complexer. Le greffage de groupements amine permet la formation de CDs cationiques qui interagissent plus fortement avec les acides nucléiques. Les CDs peuvent donc être utilisées en transfection. Par ailleurs, la capacité de certaines CDs de déstabiliser les membranes favorise l'association et la prise en charge des oligonucléotides [96].

Des dérivés de CDs cationiques ont démontré une plus grande capacité de liaison aux nucléotides. La 2,6-dimethyl-β-cyclodextrine associée à l'ADN permet une transfection 180 fois supérieure à celle de l'ADN nu. Freeman et coll. (1996), montrent que l'utilisation de β-cyclodextrine comme adjuvant dans une formulation lyophilisée de complexes de DOTAP et d'ADN pour une instillation intra-trachéale chez le rat augmente l'efficacité de transfection [97]. Les CDs cationiques interagissent également directement avec l'ADN et forment des complexes d'une centaine de nanomètres efficients pour la transfection. Cryan et coll. (1996), montrent que des cyclodextrines de type heptakis (6-amino-6-deoxy)-β-cyclodextrine présentent une efficacité de transfection en présence de sérum égale à celle du DOTAP [98]. Ces complexes présentent une charge de surface positive qui leur permet d'interagir avec les protéoglycanes membranaires. La transfection par ces complexes est augmentée en présence de chloroquine ce qui suggère que leur entrée dans le cytoplasme se fait par endocytose et non par déstabilisation de la membrane.

Ces molécules ont également été utilisées par greffage à des polymères cationiques ou des dendrimères pour diminuer leur toxicité. Le greffage de CDs à des dendrimères de PAMAM a permis d'augmenter l'efficacité de transfection de ces dendrimères *in vitro* et *in vivo* [99, 100].

Mais le greffage de CDs à des polymères cationiques donne l'opportunité d'associer de manière simple une autre fonction au complexe. Le greffage du PEI de bas poids moléculaire 600 Da avec la 2-hydroxypropyl-gamma-cyclodextrine a montré des taux de transfection intéressants *in vitro* et *in vivo*, et une diminution de la toxicité [101]. De nombreux dérivés de CDs sont synthétisés pour améliorer l'efficacité de transfection et diminuer la cytotoxicité telle que les CDs polycationiques amphiphiles (*Figure 12*).

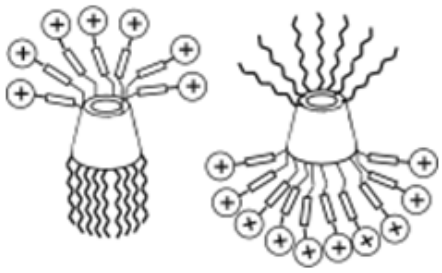


Figure 12: Représentation schématique d'une cyclodextrine polycationique amphiphiles [102].

2.3.4 LES DENDRIMÈRES

Les dendrimères peuvent être constitués de sucres (glycodendrimères), de peptides, d'amidoamines (PAMAM) ou encore de propylèneimine. Un dendrimère est une macromolécule constituée de monomères qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel (*Figure 13*).

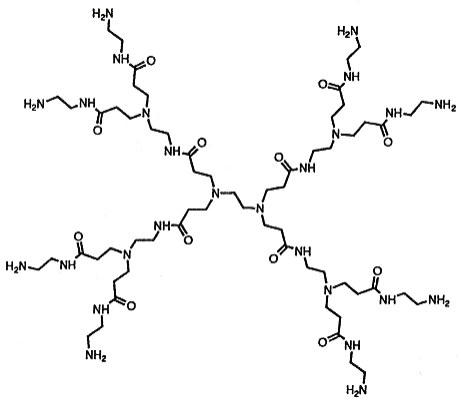


Figure 13 : Dendrimère de type PAMAM de 2ème génération.

La construction arborescente s'effectue par la répétition d'une même séquence de réactions jusqu'à l'obtention, à la fin de chaque cycle réactionnel, d'une nouvelle génération et d'un nombre croissant de branches identiques. Après quelques générations, le dendrimère prend généralement une forme sphérique globulaire, hautement ramifiée et plurifonctionnalisée grâce aux nombreuses fonctions terminales présentées en périphérie. Les diverses ramifications ménagent entre-elles des cavités internes. Les complexes peuvent donc être formés en utilisant les cavités formées au sein du dendrimère ou en greffant la molécule à une fonction terminale [103]. Deux classes sont utilisées très fréquemment en transfection du fait de leurs propriétés chimiques : les poly(amidoamines) et les poly(propylène imines) [104].

Les poly(amidoamines) (PAMAMs) constituent la première famille de dendrimère décrite. Ce sont des dendrimères dont le monomère est un amidoamine. Leur première utilisation en transfection est rapportée par Haensler et Szoka (1993) [105]. C'est la présence de nombreuses fonctions amine secondaires et tertiaires qui les rend efficients pour cette indication. Les groupements amine terminaux permettent l'interaction avec les groupements phosphate de l'ADN. L'ADN s'enroule autour des dendrimères pour former des complexes dont la taille a été évaluée pour des polyamidoamines de 6^{éme} génération à 50 nm [106, 107]. Le type de polyamidoamine utilisé fait varier le complexe mais également l'efficacité de transfection. Ainsi un dendrimère de 3^{éme} génération ne complexe pas l'ADN. Au delà de la 4^{éme} génération et d'un excédant de charge, les polyamidoamines complexent l'ADN et forment des particules de charge nettement positive. L'efficacité de transfection augmente de manière exponentielle entre la 4^{éme} et la 10^{éme} génération avec un plateau à la 8$_{ième}$ génération [108]. La formation des complexes n'est influencée ni par la concentration en sel ni par le pH. Ils présentent donc une bonne stabilité dans les conditions physiologiques. La dissociation du complexe n'intervient qu'en présence de détergent ionique tel que le SDS. Les PAMAMs sont efficaces sur de nombreux types cellulaires. Leur efficacité est 10 à 100 fois supérieure à celle des lipides

cationiques [109]. Les PAMAM présentent une efficacité de transfection pratiquement égale à celle du PEI, et une plus faible toxicité [110].

Diverses modifications à la structure de base du dendrimère composé de PAMAM ont été étudiées pour améliorer l'efficacité de transfection. Ces modifications prennent en compte différents paramètres : la cytotoxicité, la formation de complexe, la liaison du dendrimère à la cellule, sa libération de l'endosome, et le ciblage de cellules. Par exemple, un groupement PEG a été rajouté avec le dendrimère composé du PAMAM dans le but d'améliorer l'efficacité de transfection [111].

L'utilisation de polyamidoamines partiellement dégradées par hydrolyse dans l'eau ou dans le butanol a été évoquée par Tang et coll. (1996) [107]. Leur capacité de transfection est supérieure à celle des dendrimères natifs. Cette variation n'est pas due à des variations dans la morphologie du complexe, celui-ci présentant la même forme et la même taille que les complexes formés avec des dendrimères non dégradés. C'est leur plus grande flexibilité qui est à l'origine de cette différence. En effet la forme native est compacte et ne permet pas de remaniement de la molécule. Les formes dégradées présentent une conformation développée du fait de la répulsion entre les groupements terminaux. Lorsqu'ils sont complexés avec de l'ADN du fait de la neutralisation des charges terminales, les PAMAMs présentent une forme plus compacte. Au sein des endosomes leur pouvoir tampon va permettre l'augmentation en charge du polymère. La quantité de polymère nécessaire pour complexer l'ADN est donc moins importante et une partie est libérée dans le milieu. Ces molécules reprennent alors une forme développée. Ce phénomène de gonflement des polymères participe au gonflement des endosomes qui mènera à leur éclatement et à la libération des complexes dans le cytoplasme. Ceci est corroboré par le fait qu'il existe un taux optimal de dégradation. Au dessus de ce taux

la gêne stérique est trop importante pour permettre ces changements de conformation. Au dessous, les molécules sont trop petites pour participer à ce phénomène.

Leur faible toxicité en fait un vecteur intéressant pour une utilisation *in vivo*. Ainsi ils présentent une efficacité de transfection supérieure au PEI branché de 25 kDa dans le cadre d'une étude sur la transfection d'artères carotides de lapin [112], mais une plus faible efficacité au niveau pulmonaire après administration intratrachéale [113].

Très récemment une équipe a montré des résultats intéressants dans le cadre d'une thérapie anti-cancéreuse. En association avec un plasmide, l'administration systémique de complexes formés de dendrimères poly(propylène imine) et de transferrine présente une efficacité dans l'arrêt de la croissance tumorale et mène à la prolongation de la survie des souris [114].

2.3.5 LES PARTICULES POLYMÉRIQUES

Depuis quelques années, un des axes principaux de la recherche en pharmacie galénique concerne les vecteurs nano et microparticulaires de nature polymérique. Plus récemment, les nano- et microparticules ont trouvé leur place en thérapie génique comme un outil pour la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques.

Les microparticules sont des systèmes de taille compris entre 1 et 1000 µm, alors que les nanoparticules sont définies comme étant des particules colloïdales ayant une taille comprise entre 10 et 1000 nm [115, 116] (*Figure 14*). Les nanoparticules sont plus particulièrement intéressantes dans le transfert de gènes du fait de leurs petites tailles qui leur confère une meilleure internalisation dans la cellule.

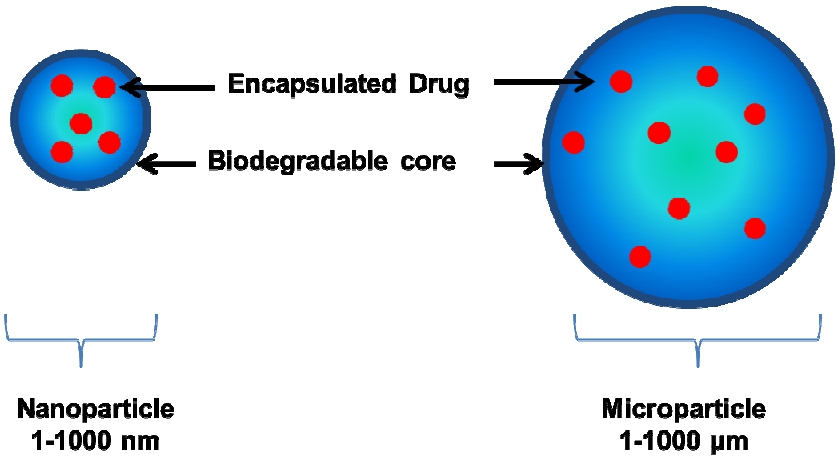


Figure 14 : Représentation schématique des nanoparticules et des microparticules.

De nombreuses particules ont été développées comme une alternative à l'utilisation des liposomes afin de contourner les problèmes de stabilité posés par ce type de vecteurs tels que les quantums Dots, les nanoparticules d'or, les nanoparticules métalliques, les nanoparticules polymériques…

L'avantage de ces systèmes particulaires est la protection des oligonucléotides par encapsulation dans la matrice polymérique [117] ou par adsorption à la surface en utilisant un polymère polycationique ou un surfactant cationique [118].

Les particules peuvent être formulées avec une grande variété de polymères ayant des propriétés différentes tels que la masse moléculaire, hydrophile ou lipophile, et leur charge. Toutes ces propriétés influent sur la propriété finale de la particule. De nombreux polymères peuvent être également utilisés pour fonctionnaliser les particules dans le but de faire du ciblage cellulaire ou de rendre les particules furtives.

Les principaux polymères utilisés pour la formulation des nanoparticules ou microparticules sont : les copolymères d'acide lactique et glycolique, les polyméthacylates, et les poly (ß-amino ester) (PBAE). Les principales études menées pour le transfert de gènes avec des

microparticules et des nanoparticules de PLGA sont respectivement présentées dans les *tableaux 4 et 5*.

- Les polyesters biodégradables, copolymères d'acides lactique et glycolique (PLGA) et acide polyl(actique) (PLA) sont parmi les polymères les plus couramment utilisés pour encapsuler des molécules et biomolécules. L'efficacité de transfection de ces particules est moindre que celle de liposomes *in vitro* mais la relation est inverse *in vivo*. Ces nanoparticules ont la capacité d'échapper du compartiment endo-lysosomal et de libérer la molécule thérapeutique dans le cytoplasme rapidement [119]. Par ailleurs, la dégradation progressive de ces particules entraîne également une expression prolongée du transgène *in vivo*. Par exemple l'expression du transgène β-galactosidase a été détectée jusqu'à 28 jours après injection intramusculaire de particules de PLGA contenant les plasmides dans un modèle murin [120].

- Les polyméthacrylates sont des polymères cationiques qui possèdent la capacité de condenser les nucléotides en nanoparticules. Plusieurs polyméthacrylates tels que le poly [2 - (diméthylamino) éthyl méthacrylate] (DMAEMA) et ses co-polymères ont été utilisés pour la transfection de l'ADN. Une gamme de polyméthacrylates, de poids moléculaire et de structure chimique différente, a été évaluée pour leur potentiel en tant que vecteur de gènes [121, 122]. Il a été montré que les polyméthacrylates ne contenant que des groupes amine tertiaires ont des effets similaires à la PEI en termes d'efficacité de transfection tout en affichant un meilleur profil de biocompatibilité [122]. Récemment une équipe a formulé des nanoparticules cationiques avec des polyméthacrylates disponibles dans le commerce tels que l'Eudragit® E100 en combinaison avec du PLGA, et un surfactant cationique, le cétyltriméthyl-bromure d'ammonium (CTAB). Les résultats ont montré une efficacité de transfert *in vitro* et *in vivo* 10 fois plus importante que celle de nanoparticules de PLGA seul [123].

- Les poly(ß-amino ester) (PABE) sont des polymères cationiques biodégradables et de nature non-toxique. Les PBAE sont utilisés pour leur différente masse moléculaire, leur fonction chimique terminale, la taille conférée lors de leur complexation avec l'ADN et leur rapport N/P. Les polyplexes de PBAE formés avec l'ADN ont montré une efficacité de transfection similaire au PEI et une moindre toxicité *in vitro* [124]. Les PBAE sont souvent utilisée en association avec le PLGA pour formées des particules qui ont montrés une efficacité en diminuant la taille des tumeurs chez la souris transfectée par le gène codant la luciférase [125]. Les particules de PBAE/PLGA ont également montré une libération prolongée du plasmide pendant 4 jours [126].

.

AUTEURS	POLYMERE ET ADN	METHODES DE FABRICATION	TAILLE (µM)	ENCAPSULATION/ ADSORPTION	MODELE CELLULAIRE	RESULTATS	
						TOXICITE	TRANSFECTION
Walter, et coll. (1999) [127]	- **PLGA** (Resomer RG502, MW 13 700) - **pGFP**	Spray-drying	10	Encapsulation	Lignée cellulaire : 293	NR	<u>In vitro :</u> 24h = 80%, après 20sec de sonication
Little, et coll. (2004) [125]	- **PLGA** (Resomer RG502) -**poly-ß amino ester** - **pCMV-Luc**	Double émulsion	4-6	Encapsulation	Macrophage : P338D1	NR	<u>In vitro :</u> - 25%=PBAE/75%PLGA augmente 3-5 fois taux de transfection par rapport NPs PLGA seul -Les microparticules contenant 35 et 50% PBAE sont moins efficaces
Little, et coll. (2005) [126]			5-8			MPs contenant PBAE plus sont toxiques que les microparticules de PLGA seul	
Howard, et coll. (2004) [128]	- **PLGA** - **PEI** - **PEG** - Plasmide codant pour la **ß-galactosidase**	Double émulsion	2	Encapsulation Complexe PEI/ADN (N/P=5) recouvert de PEG	Cellule du mélanome humain : B16F10	NR	<u>In vivo :</u> Administration par voie orale après 3 jours dans la rate : -501 667 RLU/mg de protéines
Oster, et coll. (2005) [129]	- **PLGA** (Resomer RG502) -**PEI** (Mw : 25 kDa) - **CTAB** (agent cationique) - **pLUC-CMV**	Double émulsion (Encapsulation PEI)	1 – 63	Adsorption	Fibroblastes de souris : L929	Toxique	<u>In vitro :</u> -RG502H+PEI 10% - 50% ≈ PEI/ADN=5

AUTEURS	POLYMERE ET ADN	METHODES DE FABRICATION	TAILLE (µM)	ENCAPSULATION/ ADSORPTION	MODELE CELLULAIRE	TOXICITE	TRANSFECTION
Kasturi, et coll. (2005) [130]	-**PLGA** (RG 502H) - **PEI** (70kDa et 25kDa) branché - pgWiz codant pour la **luciférase**	Double émulsion (Liaison Covalente PEI)	NR	Adsorption ADN	Macrophage : RAW264.7	-MPs PLGA 100% viabilité. - MPS PLGA/PEI conjugués à la surface des microparticules= 20% toxicité -PEI/ADN 80% toxicité	<u>In vitro :</u> - MPs PLGA conjugués à la PEI sont les seuls à transfecter les macrophages comparés au MPs de PLGA encapsulent pDNA
Zhang, et coll.(2007) [131]	-**PLGA** - **PAMAM** (G3-G6) - **PEI** (25kDa) -pVR1255 codant pour la **luciférase**	Double émulsion	2-3,2	-Encapsulation (MPs PLGA simple) -Adsorption (MPs PLGA PAMAM, et MPs PLGA-PEI)	-HEK293 : rein embryon humain - Cos-7 : rein de *SINGE* africain	- MPs PLGA/pDNA et MPS PLGA/PAMAM non toxiques sur les Cos-7. - Toxicité similaire au MPs PLGA/PEI-ADN sur les cellules HEK298.	<u>In vitro</u> : -MPs PLGA/PAMAM transfectent mieux que PLGA seul. - PLGA-PAMAM G3 transfectent 7 à 11 fois mieux que les MPs PLGA-ADN sur les HEK193 et cos-7 respectivement
Kakade, et coll.(2009) [132]	-**PLGA** - **PE**I (25 kDa) - MPs (Polystyrène) - Plasmide codant pour la protéine **phosphate alcaline**	-Simple émulsion	2-6	Adsorption du complexe PEI/ADN sur les MPs PLGA ou PS	Macrophage : J774.1	NR	<u>In vitro</u> : - MPS PLGA adsorbant le complexe PEI/ADN sont efficaces pendant 9 jours

Tableau 4 : Etudes réalisées avec des microparticules polymériques pour le transfert de gènes (NR : Non renseigné).

AUTEURS	POLYMERE ET ADN	METHODES DE FABRICATION	TAILLE (NM)	ENCAPSULATION/ ADSORPTION	MODELE CELLULAIRE	RESULTATS	
						TOXICITE	TRANSFECTION
Cohen, et coll. (2000) [133]	-**PLGA** -pcDNA3 codant pour **l'alcaline phosphate**	Double émulsion	530-630	Encapsulation	-Cellule endothélial : 293 -Fibroblaste : NIH 3T3	NR	- NP PLGA augmente d'environ 100 fois l'expression du gène après 48h et 1000 fois après 1 semaine
Oster, et coll. (2003) [134]	-**PLGA** (RG 502 H) avec modification de la fonction amine - pCMV-luc codant pour la **luciférase**	Déplacement de solvant et évaporation	160-600	Encapsulation	Fibroblastes L929 de souris	NR	Plus le nombre d'amine sont modifiées, plus la transfection augmente.
Bivas-Benitas, et coll. (2004) [135]	- **PLGA** - **PEI** (25kDa, branchée) - V1Jns codant pour **l'Ag 85B**	Déplacement de solvant	200	Adsorption	Cellule épithélial du poumon : Calu-3	Entre 10 à 40% de toxicité selon le ratio PLGA/PEI	Un faible taux de fluorescence est observé dans les cellules
Kim, et coll. (2005) [118]	- **PLA** (Mw= 10,600) -**PLGA 50** (Mw= 50 000- 75 000) -**PLGA 75** (Mw= 90 000-126 000) -**PEI** (Mw= 64 000) - **ß-galactosidase**	Diafiltration	100-600	Adsorption	Cellule embryonnaire humain: HEK 293	-PLGA (50 et 75)/PEI =10% de toxicité - PLA/PEI = pas de toxicité - PEI/ADN = 40% de toxicité	- PLGA(50)/PEI=10mU galactosidase - PLGA(75)/PEI= 10mU galactosidase - PLA/PEI =10mU galactosidase -PEI/ADN= 30mU
Csaba, et coll. (2006) [136]	- **PLGA** (RG 503 H) - **Pluronic® F68** - **Tetronic® 904** - **pEGFP-C1**	Technique de diffusion du solvant	160-180	Encapsulation	Cellule embryonnaire humain: HEK 293	NR	<u>In vitro :</u> Le nombre de cellules transfecté est important mais la fluorescence est faible

AUTEURS	POLYMERE ET ADN	METHODES DE FABRICATION	TAILLE (NM)	ENCAPSULATION/ ADSORPTION	MODELE CELLULAIRE	RESULTATS	
						TOXICITE	TRANSFECTION
Gvili, et coll. (2006) [137]	- **PLGA** (RG 502, Mw= 20 kDa ou 100 kDa) - pIRES-**EGFP** et pGL3-**Luciférase**	Double émulsion	200-1500	Encapsulation	- Cellule de singe d'Afrique : Cos-7 - Cellule de thymus canin : Cf2th	-NP PLGA= pas toxique sur la lignée Cf2th. - NP PLGA = toxique sur la lignée Cos-7 à partir de 600mg/ml (20%)	<u>In vitro :</u> - NP de PLGA/ADN= 200 fois plus sur les Cos-7 et 250 fois plus sur les Cf2th que l'ADN seul.
Oster, et coll. (2006) [138]	- **PLGA** (502 H) -DEAE -DMAPA -DEAPA - pLuc-CMV codant pour la **luciférase**	Déplacement de solvant et extraction	200-1000	Adsorption	Fibroblaste de souris : L929	- Faible toxicité 10%, augmente en présence d'amine modifiée	I<u>n vitro :</u> NP PLGA-DEAPA donne des taux d'expression de la luciférase 41 000 fois plus que l'ADN seul. NP PLGA-DEAE donne des taux d'expression 2,3 fois plus que l'ADN seul
Chumakova, et coll. (2007) [139]	- **PLGA** (RG 504 H) - **jetPEI™** - LacZ exprimant la **ß-galactosidase**	Double émulsion, et filtration	200	Adsorption du complexe PEI/ADN	cellules cancéreuses humaine de la prostate : DU 145	NR	<u>In vivo :</u> NP PLGA-PEI/ADN = environ 2% de transfection -après sonication = 10% de transfection
Kanazama, et coll. (2009) [140]	- **PLGA** (Mw= 14 kDa) - **PEI** (750 kDa) - pE**GFP**-N1	Spray-Drying	140-1000	Adsorption	- Cellule de singe d'Afrique : Cos-7 - dérivées de monocyte humain ne se divisant pas : hMoDCs	- 0 et 300V= aucune toxicité - 500V= 60% de toxicité	- NP PLGA/PEI transfecte mieux les cellules Cos7 que les cellules hMoDCs

Tableau 5 : Etudes réalisées avec des nanoparticules de PLGA pour le transfert de gènes.

3 LES DIFFÉRENTES ÉTAPES ET LES MÉCANISMES DU TRANSFERT DE GÈNES PAR LES VECTEURS NON VIRAUX

Le succès d'un transfert de gènes est largement dépendant du comportement du vecteur au cours de son trajet entre le site d'injection et le noyau de sa cible cellulaire. Ce parcours est jalonné d'étapes limitantes qui affaiblissent ou inhibent les capacités du vecteur à délivrer le gène au noyau cellulaire qui constitue sa cible. (*Figure 15*).

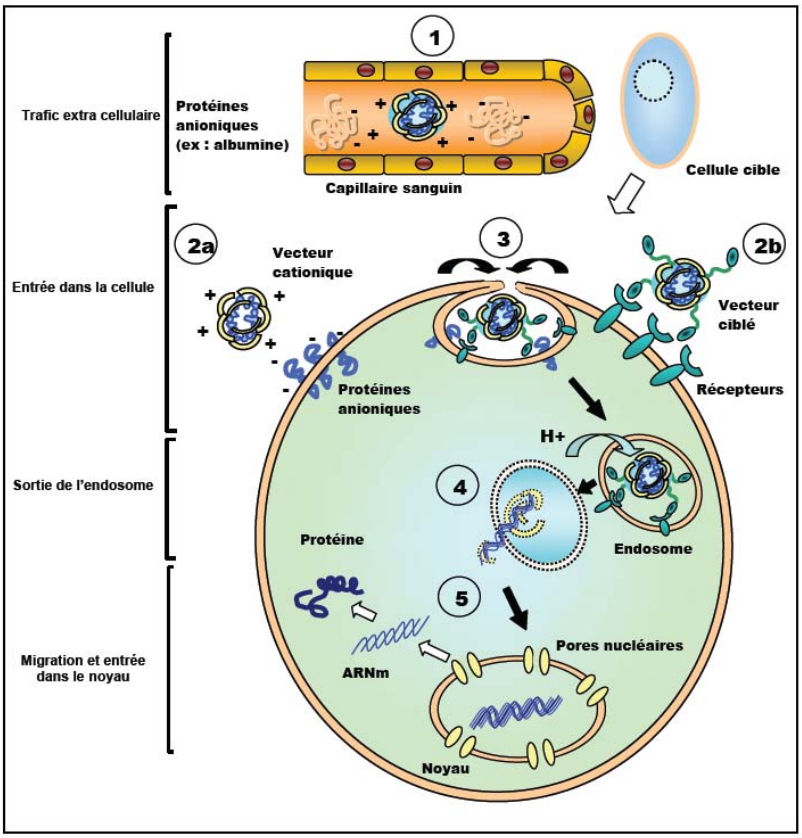


Figure 15 Les barrières du transfert de gènes.
1) trafic extracellulaire, 2) adhésion spécifique ou non avec la membrane cellulaire, 3) endocytose, 4) sortie des endosomes, 5) trafic intracytosolique migration vers et dans le noyau.

De nombreuses barrières biologiques limitent l'entrée des acides nucléiques dans les cellules. Les plus importantes à franchir lors du transfert de gènes dans la cellule sont : la membrane cytoplasmique puis la paroi nucléaire. Le compartiment endosomal représente également un

obstacle au transfert de gène, tout comme la dégradation de l'ADN par les protéines sériques. En clinique, le transfert de gènes peut se faire par deux stratégies différentes : *ex vivo* ou *in vivo*. Un traitement *ex vivo* implique un prélèvement des cellules du patient, leur modification par transfert de gènes *in vitro* puis leur réinjection chez le patient. Un traitement *in vivo* implique l'injection des acides nucléiques directement aux patients. L'utilisation de différents vecteurs présentés chapitre 2, capables de surmonter les barrières biologiques citées précédemment est fondamental pour favoriser l'entrée du gène thérapeutique dans la cellule cible ou le noyau.

3.1 LE TRAFIC EXTRACELLULAIRE

Dans les expériences de transfection *in vitro,* la présence des protéines sériques constitue le seul obstacle que rencontre le vecteur pour atteindre la surface cellulaire. Lorsque ces expériences sont réalisées en présence de plasma, une inhibition de la transfection des cellules en culture par les vecteurs non viraux est généralement observée.

In vivo, ces protéines ainsi que le long cheminement du vecteur depuis son site d'administration jusqu'à la cible cellulaire, et les différentes barrières physiologiques que le vecteur doit surmonter ou traverser pour atteindre la cellule cible constituent, en revanche, des handicaps majeurs à l'efficacité des vecteurs synthétiques (et des vecteurs viraux). De nombreux facteurs et acteurs (mode d'administration, prolifération cellulaire, densité de charge, disponibilité des récepteurs de surface, capacité des cellules à endocyter, présence de sels, protéines, lipides, sucres, opsonines ou enzymes dans les différents milieux biologiques, circulations sanguine, et lymphatique, etc…) influent en effet sur la destinée *in vivo* des vecteurs non viraux et donc sur leur efficacité. Par conséquent, le modèle des cultures cellulaires ne reflète pas, et de loin, la totalité de tous ces facteurs biologiques critiques pour la délivrance du gène *in vivo*. La prolifération cellulaire, même pour des cellules tumorales, est

très nettement moins rapide *in vivo* qu'en culture. Mises à part les cellules du MPS (système phagocytaire mononucléé) dont la fonction principale est d'endocyter les éléments exogènes, la capacité des autres cellules à endocyter est généralement faible. Les cellules *in vivo* étant entourées d'une matrice interstitielle, polarisée et même couplée à des cellules adjacentes, leur capacité à endocyter est également très différente de celle des cellules en culture. Au total, il est donc extrêmement difficile d'apprécier, à partir de données *in vitro*, les propriétés des complexes administrés *in vivo*, et cela d'autant plus que leurs propriétés physico-chimiques peuvent être modifiées radicalement *in vivo* par les constituants des fluides biologiques dans lesquels ils sont placés. Par ailleurs, il est également très fréquent que les résultats d'évaluations *in vivo* et *in vitro* ne soient pas corrélés entre-eux. Enfin, il est également relativement difficile de comparer les divers systèmes entre eux, car les études de transfection sont rarement réalisées dans des conditions identiques. Enfin, quand une telle comparaison est possible, il n'est pas aisé d'extrapoler ces résultats à une autre lignée cellulaire et cela encore moins dans le cadre d'une évaluation *in vivo*.

3.2 L'ENTRÉE DANS LA CELLULE

L'ADN nu se lie très difficilement à la membrane cellulaire suite aux répulsions électrostatiques entre l'ADN polyanionique et les charges anioniques présentes à la surface de la membrane cellulaire. Ceci n'est pas le cas des vecteurs non-viraux qui interagissent avec la membrane cellulaire d'autant plus fortement qu'ils sont chargés positivement et que la membrane cellulaire exprime des protéines anioniques.

Les complexes ou les particules de taille plus faible seront plus aisément endocytés par les cellules. Cependant, les mécanismes d'entrée de ces vecteurs sont encore mal connus. Deux

hypothèses dominent, la principale étant la voie de l'endocytose [141]. L'autre hypothèse suggère que le complexe fusionne avec la membrane, libérant l'ADN dans le cytoplasme [36].

3.3 LE TRAFIC INTRACELLULAIRE

Après adhésion à la surface cellulaire, les vecteurs non viraux pénètrent dans la cellule le plus souvent par un phénomène d'endocytose impliquant des puits de clathrines. Ce phénomène peut être non-spécifique s'il ne fait intervenir que les interactions électrostatiques ou être contrôlé par un récepteur dans le cas où les vecteurs portent un ligand spécifique de ce récepteur et que la formation du complexe ligand-récepteur entraîne l'internalisation de ce complexe. Une fois internalisés, les vecteurs non viraux se retrouvent piégés dans des endosomes dits précoces. Pour atteindre leur cible nucléaire, ils doivent obligatoirement s'échapper de ces endosomes le plus rapidement possible pour éviter la dégradation de l'ADN. Les endosomes ont en effet pour fonction de dégrader les composants intravésiculaires inutiles au fonctionnement de la cellule. Les endosomes précoces progressent lentement vers l'intérieur des cellules et après une acidification croissante suite à l'action de pompes à protons ATPases dépendantes vont évoluer en endosomes tardifs. Ceux-ci fusionnent avec des lysosomes, vésicules renfermant des hydrolases (dont des nucléases), dans lesquels le pH est d'environ 5. Les particules endocytées subissent alors une dégradation par ces enzymes. Ainsi, l'ADN, pour ne pas être dégradé lors de ce processus, doit quitter les endosomes avant qu'ils n'aient fusionné avec les lysosomes.

3.4 LA TRANSCRIPTION

L'avant dernière étape consiste à la transcription de l'ADN plasmidique en ARN messager. Cette étape a lieu dans le noyau cellulaire et nécessite que l'ARN polymérase de la machinerie cellulaire se fixe sur le promoteur du plasmide. Par conséquent, le choix du promoteur revêt une importance particulière. Le promoteur cytogémalovirus (pCMV) apporte une meilleur efficacité de transfection *in vivo* du plasmide que les promoteurs SV40, thymidine kinase (TK) ou d'adénovirus.

Le choix des promoteurs peut également se porter sur des promoteurs réglables, dont l'expression peut être induite ou réprimée, ou sur des promoteurs spécifiques d'un type cellulaire. Ces derniers présentent l'avantage de ne permettre une expression du transgène que dans des cellules bien précises. La dernière étape qui consiste à traduire l'ARN messager en protéine est elle aussi sous le contrôle de la machinerie cellulaire.

3.5 EXPRESSION CYTOPLASMIQUE DU TRANSGÈNE

La faible efficacité du transport nucléaire de l'ADN plasmidique par les systèmes synthétiques de transfert de gènes est un des problèmes majeurs à résoudre. Pour s'affranchir de cette étape limitante de l'expression du transgène, l'utilisation de systèmes permettant aux gènes d'être exprimés au niveau cytoplasmique a été explorée. De tels systèmes offrent des perspectives intéressantes pour le futur car ils sont en principe adaptables à n'importe quel type cellulaire. Il n'est pas non plus nécessaire que la cellule soit en division pour que le transgène puisse être exprimé au niveau du cytoplasme.

Une première stratégie, qui repose sur la délivrance simultanée dans le cytoplasme de la protéine ARN T7 polymérase, et d'un plasmide qui contient un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur T7, a été élaborée. Cette polymérase, d'origine bactérienne, a la

particularité de transcrire l'ADN plasmidique en ARN messager dans le cytoplasme, avec une efficacité bien supérieure à celle de polymérases eucaryotes. Par ailleurs, cette polymérase ne pénètre pas dans le noyau. Ce système a conduit à une expression du transgène dans le cytoplasme avec une cinétique relativement plus rapide (8-10 h) que celle qui nécessite un transport nucléaire du gène. Mais l'expression obtenue avec ce système s'est révélée transitoire (2-3 jours), ceci ayant été attribué à la dégradation/inactivation de la polymérase dans la cellule.

4 LES MÉTHODES PHYSICOCHIMIQUES AMÉLIORANT LA TRANSFECTION

4.1 LES MÉTHODES PHYSIQUES

Plusieurs méthodes physiques ou mécaniques telles que la micro-injection, le canon à ADN, la sonoporation, l'irradiation laser, l'injection hydrodynamique, l'électroporation ou électrotransfert (pour revue détaillée, voir [142] et [143]) ont été testées.

4.1.1 MICROINJECTION

La microinjection consiste à injecter directement le matériel génétique dans le cytoplasme ou le noyau d'une cellule en utilisant une micropipette de verre, un système de précision pour contrôler le mouvement de la micropipette, un microinjecteur et un microscope. Le matériel génétique est introduit dans la cellule par la pression hydrostatique. Cette technique est simple mais contraignante puisque chaque cellule est traitée séparément.

4.1.2 CANON À ADN

Le canon à ADN ou « gene gun » consiste à adsorber l'ADN nu autour de particules métalliques inertes (tels que l'or ou le tungstène), et de les propulser à l'aide d'un gaz dans la cellule ou le tissu. Cette technique a été utilisée pour la première fois dans les cellules végétales en 1987 [144]. Au début des années 1990, elle a été étendue aux cellules et aux tissus de mammifères [145, 146]. Une récente étude a permis de trouver une alternative à l'introduction de métaux dans l'organisme. Lee et al ont utilisé des nanoparticules de chitosan en combinaison avec le système « gene gun », et ont obtenu des résultats similaires aux particules métalliques [147]. Cette technique reste principalement utilisée pour l'immunisation dans la peau [148].

4.1.3 SONOPORATION

La sonoporation consiste à appliquer des ultrasons qui permettent la perméabilisation de la membrane des cellules et d'augmenter la pénétration des molécules. L'ADN nu est co-injecté avec des microbulles (1 à 3 µm) constituées de protéines, lipides ou polymères et remplis d'air ou d'un gaz inerte. On peut citer par exemple les microbulles de Optison™ constituées de perfluoropropane encapsulées dans une sphère d'albumine humaine.

Le premier résultat de transfert de gènes par sonoporation a été décrit dans les années 90 [149]. Depuis, cette technique a été utilisée dans une grande variété de tissus parmi lesquels le muscle squelettique [150], les tumeurs solides [151] ou les cellules neuronales [152].

4.1.4 IRRADIATION LASER

L'irradiation laser repose sur l'utilisation d'une source laser (exemple laser argon). Le mécanisme d'action s'explique par une perméabilisation transitoire de la membrane au niveau du faisceau probablement dû à un effet thermique local. Cette perturbation permet à l'ADN de pénétrer dans la cellule. Le premier résultat de transfert de gènes par irradiation laser a été

décrit en 1987 [153]. L'inconvénient de cette technique est son coût élevé et l'infrastructure lourde qu'elle nécessite.

4.1.5 INJECTION HYDRODYNAMIQUE

L'injection hydrodynamique consiste à injecter un grand volume de liquide contenant de l'ADN soit par voie intraveineuse ou par voie intra artérielle qui permet une pénétration de l'ADN en ciblant principalement les hépatocytes (injection dans la veine de la queue de la souris pour le ciblage du foie), ou les cellules musculaires (injection dans le système artériel pour cibler les muscles). Cette technique a surtout été développée chez la souris en utilisant le foie comme organe cible [154], mais des études récentes ont montré la faisabilité de cette technique sur de plus gros animaux en injection intraartérielle par l'intermédiaire de cathéters chez le singe, le chien [155, 156], et plus récemment chez le porc [157]. Un dispositif d'injection contrôlé par un ordinateur a été récemment mis au point dans le but d'obtenir un système efficace, sûr et contrôlé automatiquement [158].

4.1.6 ELECTROPORATION

L'électroporation ou électrotransfert consiste à appliquer un champ électrique au niveau du tissu cible après injection de l'ADN nu. L'électroporation utilise l'effet d'impulsions électriques pour déstabiliser la membrane cellulaire pendant de courtes périodes, permettant ainsi la pénétration du plasmide ou d'autres molécules. Cette technique a été préalablement développée pour améliorer l'entrée dans la cellule de molécules ou principes actifs peu perméables. La première étude de transfert de gène à l'aide d'électroporation à été menée en 1982 par l'équipe de Neumann et coll. (1982) [159]. Il a été montré que l'ADN pouvait être introduit dans des cellules de souris en suspension à l'aide d'impulsions électriques. A la fin des années 80, l'électroporation *in vivo* voit le jour, et est appliqué aussi bien sur l'animal qu'aux plantes [160]. Actuellement, cette technique est utilisée aux chevets des patients dans le

transfert de molécule anti-cancéreuses (tels que bléomycine ou cisplatine). Mais aussi plus récemment, dans le traitement cutané et subcutané des tumeurs [161].

5 INTERNALISATION PHOTOCHIMIQUE (PCI)

5.1 HISTORIQUE

La membrane cellulaire est une barrière semi-perméable qui contrôle les échanges de molécules entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Seul un nombre limité de molécules hydrophobes peut pénétrer dans le cytoplasme en traversant la bicouche lipidique, d'autres doivent pénétrer par l'intermédiaire du processus d'endocytose. Bien que la plupart des molécules puissent être endocytées plus ou moins efficacement dans la cellule, de telles molécules finissent en règle générale par être dégradées et perdent leurs activités biologiques dans l'endosome ou le lysosome. Dans ce contexte, la molécule d'intérêt doit s'échapper de la vésicule avant sa dégradation. Ainsi, la membrane endosomale constitue une barrière sévère pour les molécules. Récemment, une étude clinique de phase I montrent des résultats préliminaires encourageants pour le traitement des cancers en association avec la bléomycine [162].

L'internalisation photochimique est une technique innovante développée par K. Berg depuis les années 1999 [163]. Depuis, cette technique est en progrès régulier dans le cadre du transfert de gènes *in vitro* et *ex vivo* avec l'utilisation de différents agents de transfection *(Tableau6).*

Transfection agent	Enhancement achieved with PCI,-fold	Comments
Poly-*L*-lysine	10-100	PCI generally gives positive effects in most cell lines tested
Polyethyleneiminie	10-25	PCI includes positive effect similar to poly-*L*-lysine (two cell lines tested)
Poly-arginine	10	Unpublished
Transferrin-polylysine	0-200	Cell type dependent
DOTAP[1]	Negative to 5	Best PCI effects with short transfection times (≤ 1h)
BAE-DMRIE[2] (cationic lipids)	0	PCI has no or negative effects
BAE-DMRIE/DOPE[3] (cationic lipids)	1.5-5	Cell type dependent; best with short transfection times (≤ 1h)
Adenovirus	0-30	Positive effects in 5 of 6 cell lines tested; less efficient in cells that normally are easily infected

[1] DOTAP = N-(1-(2,3-dioleoxyloxy)propyl1)-N, N, N, -trimethylammonium-methyl-sulfate

[2] bAE-DMRIE = N-(2-aminoethyl)-N, N-dimethyl-1-2, 3-bis(tetradecyloxyy)-1-propanaminium bromide.

[3] eDOPE= 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine.

Tableau 6 : Les différents agents utilisées en transfection avec la PCI [164]

5.2 PRINCIPE DE L'INTERNALISATION PHOTOCHIMIQUE

Comme nous l'avons déjà évoqué, la taille des particules internalisées dans les cellules est un facteur limitant fortement leur utilisation. Or, la plupart des molécules utilisées sont des macromolécules qui à de rares exceptions près, ne peuvent pas traverser directement la membrane plasmique. Elles sont généralement incorporées dans les cellules par endocytose, se retrouvent « emprisonnées » dans les endosomes et sont finalement dégradées avant qu'elles n'aient pu exercer un effet biologique. La technique d'internalisation photochimique permet d'accroître la pénétration intracellulaire des macromolécules ou des complexes supramoléculaires (protéines, plasmides, polymères). La PCI repose sur la destruction photochimique des vésicules d'endocytose obtenue par photoirradiation de cellules ou de tissus préalablement exposés à un agent photosensibilisant se localisant au niveau membranaire. Le photosensibilisant s'incorpore dans la membrane plasmique des cellules

cibles. Il y a formation des endosomes photosensibilisés contenant le complexe supramoléculaire. Après irradiation à une longueur d'onde spécifique, le photosensibilisant passe d'un état normal à un état d'excitation singulet en absorbant l'énergie d'un photon. Le photosensibilisant singulet passe très rapidement à un état d'excitation triplet et produit des espèces réactives de l'oxygène, l'oxygène singulet en particulier (*Figure 16*). L'oxygène singulet est un agent d'oxydation capable d'oxyder diverses biomolécules notamment d'induire des dommages dans la membrane des endosomes et de les détruire.

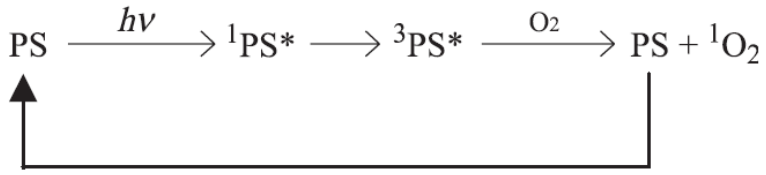


Figure 16 Présentation schématique de la réaction photochimique. (PS) photosensibilisant ; (1PS) photosensibilisant excité à l'état singulet ; (3PS*) photosensibilisant excité à l'état triplet ; (1O2) oxygène singulet. D'après hogset et coll. [165].*

In vitro, la technique de PCI a montré une libération de l'endosome de diverses molécules d'intérêt, mais aussi un effet biologique. Cette technique a été largement utilisée pour un grand nombre de molécules, surtout pour l'ADN avec une augmentation nette de l'expression de gène comparée à une transfection simple. Le principe technique est présenté dans la *figure 17*. Le photosensibilisant est déposé sur les cellules et s'incorporent dans la membrane plasmique des cellules cibles. Le complexe ADN vecteur est déposé sur les cellules, formation des endosomes photosensibilisés contenant le complexe ADN vecteur. Après irradiation avec une lumière à la longueur d'onde spécifique, le photosensibilisant excité produit des espèces réactives de l'oxygène et entraine la rupture de la membrane et le relargage du complexe ADN vecteur dans le cytosol.

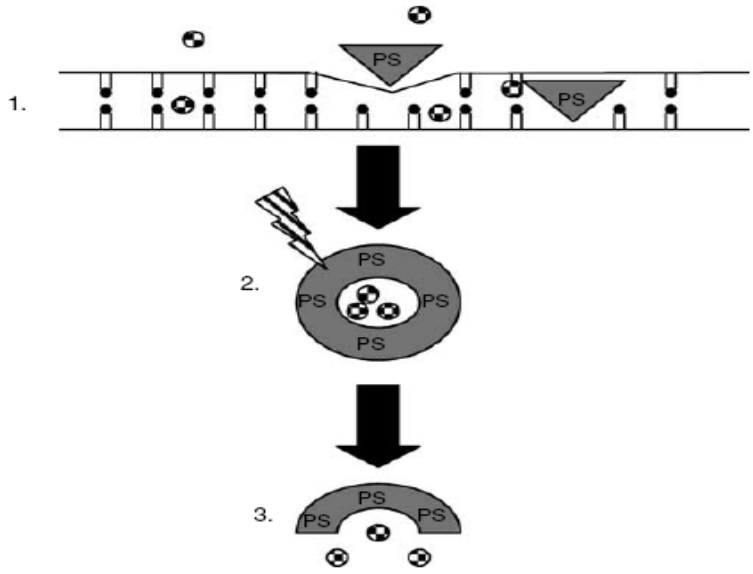


Figure 17 : Réalisation in vitro de la technique d'internalisation photochimique.

5.2.1 CHOIX DE LA DOSE DE LUMIÈRE

Pour induire la réaction photochimique entrainant la destruction de la membrane endosomale, il est nécessaire d'appliquer une dose de lumière au-dessus d'un certain seuil. De plus, la concentration en photosensibilisant dans la membrane endosomale, et la toxicité du photosensibilisant peut varier d'un type cellulaire à un autre. Il est donc essentiel de déterminer la dose optimale de lumière selon les types cellulaires.

5.2.2 CHOIX DU PHOTOSENSIBILISANT

L'efficacité de la PCI dépend très étroitement du photosensibilisant utilisé. Il s'agit en général de dérivés de porphyrines ou de phtalocyanines ($TPPS_{2a}$, $AlPcS_{2a}$) (*Figure 18*) qui vont dans un premier temps s'insérer dans la membrane plasmique. Le photosensibilisant doit répondre à certains critères pour une action optimale : il doit s'intégrer dans le compartiment endosomal, préférentiellement dans la membrane plasmique pour maximiser l'effet de rupture induit après irradiation, et minimiser la destruction des molécules situées à l'intérieur de l'endosome. L'agrégation du photosensibilisant dans la cellule doit être faible, puisqu'elle réduit la faculté du photosensibilisant de passer à un état excité et donc réduit l'efficacité du traitement photochimique.

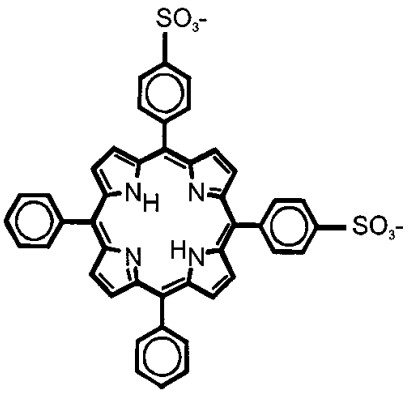


Figure 18 : Structure chimique du meso-tetraphenylporphyrine disulfonate ($TPPS_{2a}$).

5.2.3 CHOIX DE LA LIGNÉE CELLULAIRE

L'efficacité de transfection utilisant la méthode de PCI dépend aussi du type cellulaire que l'on souhaite étudier. Il a été montré que la PCI a un effet positif sur le transfert de gène sur différents types cellulaires cancéreux ou non-cancéreux (*Tableau 7*).

Cell line	Tissue	Protein transfer	Plasmid transfer	Adenovirus transfer
NHIK 3025	Cervix, carcinoma in situ	+		
NCI-H146	Lung, small cell carcinoma	+		
WiDr	Colon adenocarcinoma	+		+
KM20L2	Colon adenocarcinoma	+		
Col115	Colon adenocarcinoma	+		
HCT116	Colon carcinoma	+	+	+
T47D	Breast, ductal, carcinoma	+		
THX	Skin malignant melanoma	+	+	+
Malme-3	Skin fibroblast	+		
Malme-3M	Lung metastasis, malignant melanoma	+		
FM3	Malignant melanoma	+	+	
U87	Brain, glioblastoma	+	+	
D54	Brain, glioblastoma	+		
EB	Immortalised B cells	+		
V79	Lung fibroblasts, Chinese hamster	+		
BL2-8G-E6	Mouse fibrobblastoma	+		
COS-7	Kidney, green monkey	+		
HeLa	Cervix adenocarcinoma		+	+
COS-1	Kidney, green monkey		+	
A549	Lung carcinoma			+
FEMXIII	Malignant melanoma			+
Neuro-2	Neuroblastoma		+	
DU 145	Prostate cancer		+	
BHK	Kidney, baby hamster		+	
HFib	Fibroblast			+
Raji	Burkitt's lymphoma			+

Tableau 7 : Exemple des différentes lignées cellulaires utilisées dans le transfert de différentes macromolécules et la PCI [165].

ETUDE EXPERIMENTALE

ETUDE EXPERIMENTALE

Comme nous l'avons longuement développé, le concept de thérapie génique nécessite par nature d'avoir à disposition des vecteurs efficaces susceptibles d'assurer le transfert d'une information choisie du milieu extracellulaire jusqu'au génome.

Pour mener à bien ce transfert, les vecteurs viraux furent logiquement les premiers utilisés compte tenu de leur pouvoir infectieux naturel, mais leurs inconvénients potentiels (pathogénicité, pouvoir immunogène, manipulation non dénuée de risques et coûteuse, etc..) ont incité à rechercher d'autres vecteurs en dehors des virus. Comme nous l'avons également rapporté la recherche de vecteurs non viraux explore de multiples solutions et pose d'importants problèmes technologiques ou les techniques de pharmacie galénique apportent une large contribution.

C'est dans cette optique que s'inscrit l'objectif de notre travail puisqu'il se propose d'élaborer un « outil-vecteur d'ADN » adapté aux exigences de la transfection, et présentable sous une forme directement utilisable au chevet du patient. Son efficacité a été testée seule ou couplée à la technique d'internalisation photochimique susceptible de jouer un rôle précurseur dans le taux de transfection. C'est dans le but de créer un vecteur modèle pour le transport de gène suppresseur de tumeurs tel que le gène Pten impliqué dans de nombreux cas de cancers.

C'est dans un environnement multidisciplinaire, que nous avons en effet étudié :

- Tout d'abord, la capacité de transfection de nanoparticules polycationiques composées de polymère méthacrylique Eudragit RS et RL (**Article 1**).

- Deuxièmement, l'évaluation de la capacité de transfection des nanoparticules composées d'une association de polymère biodégradable d'acide lactique et glycolique (PLGA) et d'un polymère souvent utilisé pour le transfert de gène la polyéthylenimine. (**Article 2**).

- Troisièmement, nous avons évalué l'impact et la capacité à améliorer l'efficacité de transfert de gènes de nos nanoparticules en association à une technologie innovante l'internalisation photochimique. L'internalisation photochimique est basée sur la photoactivation d'un photosensibilisateur localisé dans les membranes cellulaires de manière à libérer des molécules thérapeutiques enfermées par endocytose dans des vésicules intracellulaires. Pour notre étude expérimentale, nous avons choisi de travailler sur les cellules cancéreuses de pharynx (FaDu) avec un photosensibilisant amphiphile le $TPPS_{2a}$., et une durée d'irradiation des cellules de 30 sec.

Ce travail démontre l'utilisation possible des nanoparticules polymériques comme un outil-vecteur d'ADN. L'utilisation de tels « vecteur-médicament » correspondant à une forme galénique stable et facile à utiliser pourrait offrir de nouveaux espoirs en thérapie génique anticancéreuse.

Article 1

Optimization of a new non-viral vector for transfection : Eudragit nanoparticles for the delivery of a DNA Plasmid

Publié dans Technology in Cancer Research and Treatment

Technol Cancer Res Treat. 2009 Dec;8 (6):433-44

1 ARTICLE 1 : OPTIMISATION DE NANOPARTICULES D'EUDRAGIT® RS ET RL POUR LE TRANSFERT D'UN PLASMIDE.

Les vecteurs non viraux à base de polymères ou de lipides offrent un nouvel élan à la thérapie génique car ils sont moins toxiques que les vecteurs viraux. De plus, les vecteurs polycationiques ont démontré leur capacité à induire des taux de transfection plus élevés que les vecteurs non cationiques, car ils favorisent une fixation de l'ADN polyanionique et un contact intime avec les membranes cellulaires chargées négativement. Nous avons donc, dans un premier temps, cherché à développer un nouvel « outil-vecteur d'ADN » correspondant à des nanoparticules à base de polymère méthacrylique (Eudragit® RS et RL) qui ont été caractérisées d'un point de vue physico-chimique (taille et potentiel zêta, taux d'adsorption d'ADN, toxicité). Deux méthodes ont été utilisées pour leur fabrication : la nanoprécipitation et la technique de double émulsion/évaporation de solvant. Ce sont des techniques rapides et simples qui permettent d'obtenir des nanoparticules d'Eudragit® RS et RL de 43 à 57nm pour la nanoprécipitation, et de 359 à 362 nm pour la méthode de double émulsion. Le potentiel zêta, positif varie de +50 à +60 mV selon la méthode utilisée, diminue en présence d'ADN jusqu'à -43mV, supposant ainsi la fixation de l'ADN sur les groupements cationiques des polymères, ce qui a été confirmé par quantification de l'ADN adsorbé sur les nanoparticules par un gel d'agarose. Selon la concentration en nanoparticules, et le type de polymère la quantité d'ADN adsorbée varie de 40 à 80%. La cytotoxicité des nanoparticules testée sur différents types cellulaires (FaDu, MDA-MB 231, MCF-7) par le test MTT montrent que les cellules FaDu sont plus « sensibles » aux nanoparticules préparées par nanoprécipitation que les autres types cellulaires (50% de mortalité à 24h). De plus, les nanoparticules préparées par double émulsion, en dépit de leur taille plus importante, ont montré une plus faible toxicité (20% de mortalité à 24h) sur les cellules MCF-7 par rapport aux nanoparticules préparées par nanoprécipitation (40% de mortalité à 24h). Enfin, les études de transfection effectuées sur les

différents types cellulaires, ont montré des taux de transfection du gène codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP) de 4 à 6%, proche de celui obtenu avec la lipofectamine (de 3 à 15%), molécule couramment utilisée en transfection. Sur les cellules de type MCF-7, ces premiers essais de transfection ont également révélé que les nanoparticules préparées par nanoprécipitation (entre 2 et 3%) amènent à des taux de transfection sensiblement plus élevés que celles préparées par double émulsion (entre 1 et 2%).

Technology in Cancer Research and Treatment
ISSN 1533-0346
Volume 8, Number 6, December 2009
©Adenine Press (2009)

Optimization of a New Non-viral Vector for Transfection: Eudragit Nanoparticles for the Delivery of a DNA Plasmid

www.tcrt.org

M. Gargouri[1]
A. Sapin, Ph.D.[1]
S. Bouali, Ph.D.[2,4]
P. Becuwe, Ph.D.[3,4]
JL. Merlin, Ph.D.[2,4]
P. Maincent, Ph.D.[1*]

[1]Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie, Nancy Université, Faculté de Pharmacie, EA 3452, 5, rue A. Lebrun, BP 80403, F-54001 Nancy, France.
[2]Unité de Biologie des Tumeurs Centre Alexis Vautrin, Vandoeuvre lès Nancy, France.
[3]Laboratoire de Biologie cellulaire, Henri-Poincaré Nancy Université, Vandoeuvre lès Nancy, France
[4]EA SIGRETO 4421, Nancy Université.

The development of new vectors to deliver DNA into cells for therapy of cancers or genetic diseases has been a major area of research for many years. However, the clinical application of this technology requires the development of efficient, reliable and sterile vectors enabling the transfer of genes *in vivo*. Non viral, polymer or lipid-based vectors offer a new impetus to gene therapy because they are less toxic than viral vectors (no endogenous recombination, fewer immunological reactions, easy production and delivery of large-sized plasmid).
The aim of this study is to develop a new tool for DNA delivery composed of methacrylic polymeric (Eudragit® RS and RL) nanoparticles. These nanoparticles were prepared by two methods: nanoprecipitation and double emulsion. The nanoparticles were characterized by their size, zeta potential and amount of DNA adsorption. Cytotoxicity tests based on mitochondrial activity (MTT test) revealed that the nanoparticles had limited cytotoxicity and that this depended on both the cell type and the nanoparticle concentration. Transgene expression was observed using the Green Fluorescence Protein gene as reporter gene, and was evaluated by flow cytometry in FaDu, MDA-MB 231 and MCF-7 cell lines. The results showed that transfection rates ranging between 4 and 7% were achieved in FaDu and MDA-MB 231 cells with nanoparticles prepared by the nanoprecipitation method. In MCF-7 cells transfected with nanoparticles prepared by either the double emulsion or the nanoprecipitation method, the transfection efficiency was between 2 and 4%. Nanoparticles prepared by nanoprecipitation were slightly more efficient than nanoparticles prepared from a double emulsion. Particle size was not an important factor for transfection, since no significant difference was observed with size between 50 and 350 nm. We showed that Eudragit® RS and RL nanoparticles could introduce the transgene into different types of cells, but were generally less effective than the lipofectamine control.

Key words: Gene therapy and delivery; Nanoparticles.

Introduction

In recent years, gene delivery systems have attracted much attention (1, 2). Two types of carrier can be used to deliver DNA or RNA to the target cells or tissues: viral or non-viral vectors. Viral vectors have been largely used for *in-vivo* gene transfer because they provide efficient intracellular delivery and high, sustained gene expression (3). However, these vectors are limited by complicated formulation, restricted gene size, and immunogenicity (4). Therefore, non-viral vector delivery systems are being developed as safer alternatives that can be administered repeatedly with low immune response, are targeted to cells or tissues targeting, not limited by plasmid size and easy to produce in large quantities (5).

Among the non-viral carriers that have been proposed are cationic liposomes (6-9), nanoemulsions (10), micelles (11), polymeric microparticles (12) and nanoparticles

*Corresponding Author:
P. Maincent
Email: Philippe.maincent@pharma.uhp-nancy.fr

(13). Polymer-based systems have been preferred recently (1, 2, 14) since they generally possess favorable physico-chemical characteristics such as loading capacity, stability and versatility (15-18). Several polymers, such as chitosan (19), polyethyleneimine (PEI) (20-23), polymethacrylates (24), poly (DL-lactide-co-glycolide acid) (PLGA) (25) and poly (DL-lactic acid) (PLA) (26) have been investigated as a means of achieving safe and sustained gene transfection.

Many physico-chemical parameters can affect the transfection efficiency of nanoparticles, including polymer type or molecular weight, nanoparticle size and charge. For example, it has been shown that particle size has a considerable influence on their uptake by tissues and cells. Furthermore, some cell lines can only take up submicron size particles efficiently but not larger sized microparticles (27, 28). Two different strategies for incorporating DNA into particles have been used: either encapsulation within the polymer matrix (29) or adsorption onto the surface of cationic particles (30-32).

In-vivo administration of DNA-encapsulating particles have shown promising results in the development of non-viral vectors for gene therapy of cancer, and demonstrated the potential of both polymeric micro- and nanoparticles to improve cancer treatment. For example, Kasturi *et al.*, (33) demonstrated that the use of PEI-conjugated PLGA microspheres, intended to deliver the MCP3-sFv20 pDNA vaccine after intradermal or intramuscular injection, were able to immunize mice to a significantly higher degree compared with naked vaccine; in addition, they were comparable to a gene gun when injected intramuscularly. However, some fundamental limitations of microparticle preparation remain, such as low encapsulation efficiency, inability to escape phagolysosomes and low bioavailability. In addition, chemical, thermal and mechanical stresses during the production of particles may lead to extensive DNA degradation (34).

More recently, with a view to limiting DNA degradation during the formulation process, Singh *et al.*, (2000) and Esposito *et al.*, (1999) have adsorbed the plasmid onto the surface of cationic particles (30, 31). Plasmid DNA is a polyanionic molecule which can be loaded on a polycationic surface by ionic interactions. Furthermore, the cationic surfactants and/or the cationic polymers constituting the cationic particles improve not only plasmid loading but also particle adsorption onto the cell surface (35).

In this study, we report the preparation of DNA-loaded nanoparticles from methacrylate ammonium polycationic polymers (Eudragit® RS and RL). The aim was to compare two preparation techniques: nanoprecipitation and double emulsion, in terms of their transfection efficiency. Both preparation methods are known to yield particles with diameters in the nanometer rather than in the micrometer range. The DNA-loaded nanoparticles were characterized and evaluated for their ability to transfect different cells types *in vitro*, using the marketed Lipofectamine 2000® kit as a point of comparison.

Materials and Methods

Materials

Plasmid pEGFP-C3 coding for Green Fluorescent Protein (GFP) was obtained from Clontech (Montigny le Bretonneux, France). Eudragit® RS PO and RL PO (MW 150,000 Da) polymers, used for the nanoparticle preparation, are acrylic polycationic copolymers of acrylic and methacrylic acid esters with a proportion of quaternary ammonium groups (0.5–0.8% and 0.8–1.2% respectively). These were generously provided by Evonik polymers (Darmstadt, Germany). The surfactants Pluronic F 68 and poly(vinyl alcohol) (99% hydrolyzed) (PVA) were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Cell culture media Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) medium were obtained from Life Technology (Ergy, France). Lipofectamine 2000® transfection reagent, a cationic lipid, was purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France).

Preparation of Cationic Nanoparticles

Nanoprecipitation Method: The Eudragit® nanoparticles were prepared as previously described (36, 37). Briefly, 300 mg of the polymer were dissolved in 15 ml of acetone. This solution was poured in the body of a glass syringe (2 mm diameter tip), and allowed to flow slowly into 50 ml of aqueous Pluronic F68® phase (0.5% w/v) under magnetic stirring (550 rpm). The organic solvent was removed by rotary evaporation under vacuum at 40°C (Heidolph, Schwabach, Germany) until 10 ml of nanoparticle suspension were obtained.

Double Emulsion Method: A double emulsion was prepared as previously described (38). Briefly, 250 mg of polymer were dissolved in 10 ml of dichloromethane (DCM). Water (1 ml), was emulsified into this organic phase by sonication (80W for 30s) using an ultrasonic homogenizer (Vibracell 75022, Bioblock, Illkirch, France). This primary water-in-oil (w/o) emulsion was then dispersed by sonication (80W for 1min) into 40 ml of an aqueous solution of PVA (0.1% w/v) producing a secondary water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion. After evaporation of the organic phase at 40°C, the resultant nanoparticles were harvested by centrifugation (42,000 g, 20 min) and re-suspended in 10 ml Milli-Q water to obtain the final nanosuspension.

Plasmid DNA Preparation

Plasmid pEGFP-C3 encoding the green fluorescent protein (GFP) was propagated in *E.Coli* and isolated using Marligen maxiprep high purity plasmid purification columns (Clinisciences, Montrouge, France). Plasmid DNA structure and purity were followed by agarose gel (0.8%) electrophoresis (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) in the presence of ethidium bromide to detect DNA bands. The DNA concentration in the preparation was determined by UV spectrophotometry (Uvikon 922, Kontron, Eching, Germany) at 260 nm.

Plasmid DNA Loading onto Nanoparticles

Loading of the pEGFP-C3 plasmid was performed by adsorption on the surface of the freshly prepared nanoparticles. Before adsorption, unloaded "nanoprecipitation" nanoparticles were sterilized by filtration (0.22 µm). Due to their larger size, nanoparticles prepared by double emulsion were only filtered on a 0.8 µm filter (Chromafil®, Macherey Nagel, Hoerd, France): sterility could still be assumed since no contamination was ever observed. A constant amount of plasmid (4 µg) was added into the nanoparticle suspension at different polymer concentrations (30, 60, 125, 250 and 500 µg/ml) at room temperature for 30 min.

The yield of the manufacturing, established on 3 different formulations, was calculated by weighing the mass of manufactured nanoparticles (obtained after freeze-drying). The average yields of manufacturing were 83% and 86% for Eudragit® RS and Eudragit® RL, respectively. After each preparation, the exact nanosuspension volume (always around 7-8 ml) was determined at the end of the evaporation process. Therefore, the concentration of nanoparticles (mg/ml) in the suspension was obtained by dividing the mass of polymer (determined initially on 3 experiments as explained before) by the volume.

In order to prepare the various nanoparticles concentrations, the exact volume of nanoparticles to be added was calculated and completed to 50 µl with a glucose 5% aqueous solution. The volumes of nanosuspension were determined by taking the exact concentration in a final volume of 50 µl. Then 50 µl of a 5% glucose solution containing 4 µg of DNA was added to the previous 50 µl of nanoparticles suspension. Incubation was maintained for 30 minutes before contact with cells. Nanoparticles were prepared extemporaneously: maximum time between nanoparticles preparation and cell transfection or cytotoxicity studies was 1 hour.

Particle Size and Zeta Potential

The nanoparticles with or without DNA were analyzed for their size distribution and their surface potential using a Malvern Zetasizer 3000E (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Each sample was measured in triplicate and the results are expressed as the mean of the three measurements.

Quantification of DNA Loading

Determination of DNA Loading Efficiency: The loading efficiency of DNA adsorbed onto nanoparticles prepared by the double emulsion method was obtained from the determination of free DNA in the supernatant after centrifugation (42,000 g, 20 min), by measuring the absorbance at 260 nm. Supernatant recovered from unloaded nanoparticles (without DNA) was used as a blank. DNA loading efficiency was expressed as adsorbed DNA (difference between the total amount of DNA added for the particle preparation and the amount of non-absorbed DNA remaining in the supernatant after centrifugation) as a percentage of the total amount of added DNA.

Gel Electrophoresis: DNA-loaded nanoparticles prepared by the nanoprecipitation method were submitted to electrophoresis on a 0.8% agarose gel for 30 min at 90V/cm (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France). Different concentrations of plasmid (25, 50, 100, 300, 500 ng) were used for calibration. Nanoparticles without DNA were used to determine the background level. Images were acquired using a Geldoc 2000 gel documentation system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) equipped with a UV transluminator. Molecular Analyst, version 1.1 software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used for band integration and background correction.

Cell Lines

FaDu pharynx carcinoma cells were kindly provided by Pr A. Hanauske (Munich University, Germany). MDA-MB 231 and MCF-7 human breast adenocarcinoma cells were provided by Pr P. Becuwe (Nancy University, France) (39). FaDu cells were grown in DMEM medium. MDA-MB 231 and MCF-7 cells were grown in RPMI 1640 medium. The media were supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin antibiotic mixture, 1% L-Glutamine 200 mM and 1% MEM non essential amino acid.

Cytotoxicity Evaluation by MTT Assay

The cytotoxicity of the nanoparticles was determined by the (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) MTT assay. This assay is based on the ability of living cells to reduce the water-soluble yellow dye, MTT, to purple water-insoluble formazan product by mitochondrial enzyme

succinate dehydrogenase. Cells were seeded in 24-well plates at 5.10^4 and 1.10^5 cells/well for FaDu and both MDA-MB 231 and MCF-7, respectively. Twenty four hours later, cells were washed twice by PBS. One hundred microliters of nanoparticles without DNA or DNA-loaded nanoparticles were added to 500 µl of serum-free medium at different concentrations of nanoparticles: 30, 60, 125, 250, 500 µg/ml. After a 4h incubation, 500 µl of 20% FBS complete medium were added for each well. After 24h incubation, 250 µl of MTT solution (2.5 mg/ml) were added to cells followed by further incubation for 4h. The formazan crystals formed were dissolved using a 25% aqueous solution of SDS (250 µl/per well). Then, 300 µl per well were transferred in 96-well plates and absorbance was read at 570 nm on a microplate reader. Cell viability was determined as a percentage of absorbance with respect to an untreated control.

In-vitro *Transfection*

The cells were placed in 24-well plates and incubated with different concentrations of DNA-loaded nanoparticles (100 µl) in 0.5 ml of serum-free medium for 4h at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere followed by addition of 0.5 ml of complete fresh medium. After 24h, the cells were washed with PBS and incubated with trypsin/EDTA for 5 min at 37°C. The cells were harvested in 1 ml of complete fresh medium (DMEM for FaDu cells and RPMI 1640 for both MDA-MB 231 and MCF-7) and centrifuged at 1,500 rpm for 10 min to eliminate the trypsin. In a final step, the cells were dispersed in 500 µl of PBS. GFP was excited at 488 nm and its fluorescence signal was detected trough a 510-520 nm band-pass filter. The mean fluorescence intensity of 10,000 individual cells was measured with FACS Calibur flow cytometer and analyzed using Cell Quest® software program (Becton Dickinson, Le pont-De-Claix, France).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. Data were presented as mean ± SD. $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results and Discussion

Characterization of Nanoparticles

It is known that particle size significantly affects their cellular uptake and in some cell lines only submicron size particles are efficient (25). Therefore, it was important to determine the size of the Eudragit® RS and Eudragit® RL nanoparticles prepared by each method: nanoprecipitation or double emulsion. It has been reported in the literature that nanoprecipitation allowed small nanoparticles (<100 nm) to be obtained (36, 37), whereas double emulsion techniques lead to larger nanoparticles (40). As shown in Table I, the mean diameter of the nanoparticles obtained in this work also depended on the preparation method. Typically, unloaded cationic nanoparticles obtained by nanoprecipitation had a diameter between 39 to 50 nm, while those formed by double emulsion were 350 to 400 nm in diameter. The size of the nanoparticles was not modified by DNA loading, but, as would be expected, the overall charge of the nanoparticles was strongly dependent on adsorbed DNA.

In several studies it has been shown that smaller nanoparticles give higher transfection efficiency than larger nanoparticles or microparticles (28). The choice of the manufacturing method is therefore critical. By using two different techniques, we were able to produce particles with the same composition but with large differences in mean diameter, so that the influence of size, if any, on the transfection process could be easily observed. Only the "nanoprecipitation" nanoparticles actually correspond to the definition of nanoparticles (*i.e.*, size less than 100 nm). "Double emulsion" nanoparticles correspond more to intermediate nano/microparticles. Nevertheless, for the sake of clarity, the word "nanoparticles" will be used for particles obtained by either the nanoprecipitation or the double emulsion process.

The physico-chemical parameters including the type of polymers may influence the transfection. Eudragit® RS 100 and RL 100 are copolymers based on cationic methacrylic acid esters, easily synthesized, not expensive and widely accepted as pharmaceutical additives. Eudragit® polymers could offer a number of advantages over other polymers (chitosan, PLGA, polyethylenimine) because they maintain unaltered physico-chemical properties for longer time periods, allowing long-time storage and are suitable for industrial production. The disadvantage of these polymers is their non biodegradability, although they are biocompatible. Nevertheless, Eudragit® RS has already been used to prepare relatively large nanoparticles (range 0.66 to 1 µm) together with different cationic surfactants for pGL3 transfection (41). However, the size of these nanoparticles was probably too large for uptake by the J774 cell line, which is one potential reason for the low transfection efficiency observed. In addition, the didecyldimethylammonium bromide (DDAB) used to prepare nanoparticles is potentially toxic. To avoid these two limitations, we prepared DDAB-free Eudragit RS and RL nanoparticles with a much smaller diameter.

The surface charge of the DNA system is another critical factor that can influence the transfection efficiency (42). First, it was important to evaluate the stability of DNA binding. This has been done by measuring the zeta potential (as a surrogate of stability) of the Eudragit® RL-DNA and Eudragit® RS-DNA nanoparticles for 25 µg of polymer (*i.e.*, nanoparticles) and 4 µg of DNA. Based on the experimental values (not

Table I
Physico-chemical characteristics of the DNA-Eudragit® nanoparticles.

Preparation method	Polymer	Ratio NP(µg/ml) -DNA (40µg/ml)	Mean particle size (nm)	Zeta potential (mV)
Nanoprecipitation	Eudragit® RS	No plasmid	57 ± 10	50 ± 2
		30	45 ± 20	32 ± 9
		60	53 ± 13	25 ± 4
		125	50 ± 11	12 ± 7
		250	47 ± 9	4 ± 2
		500	54 ± 13	-8 ± 2
	Eudragit® RL	No plasmid	43 ± 2	46 ± 1
		30	59 ± 14	30 ± 4
		60	45 ± 23	24 ± 2
		125	54 ± 10	3 ± 5
		250	39 ± 29	-8 ± 2
		500	50 ± 12	-12 ± 4
Double emulsion (w/o/w)	Eudragit® RS	No plasmid	359 ± 11	47 ± 8
		30	363 ± 20	31 ± 5
		60	353 ± 29	28 ± 3
		125	396 ± 29	21 ± 7
		250	444 ± 21	-9 ± 5
		500	425 ± 20	-17 ± 2
	Eudragit® RL	No plasmid	362 ± 12	58 ± 4
		30	315 ± 23	-9 ± 4
		60	397 ± 30	-15 ± 6
		125	358 ± 23	-16 ± 4
		250	315 ± 15	-37 ± 4
		500	286 ± 25	-43 ± 3

shown), DNA binding was considered as stable during at least 4 hours. In addition, it has to be kept in mind that nanoparticles were prepared extemporaneously: maximum time between nanoparticles preparation and cell transfection studies was 1 hour. As shown in Table I, the zeta potential of the DNA-loaded nanoparticles was affected by the nanoparticles concentration. Overall, the zeta potential of the nanoparticles decreased with the degree of DNA loading. Indeed, for both types of nanoparticles, the zeta potential ranged from high positive values (around + 50 mV) to negative values for the highest DNA loading (-12 mV and -43 mV for Eudragit® RL nanoparticles obtained by nanoprecipitation and double emulsion at the dose of 500 µg/ml nanoparticles, respectively). Plasmid DNA is a polyanionic molecule which can be loaded on a polycationic surface by ionic interactions. A cationic polymer or a combination of polymers may be used for preparation of cationic particles which, apart from facilitating plasmid loading, also, by virtue of their positive charge, helps in attachment of the particles on cell surface (43). Thus, in the case of Eudragit® nanoparticles, DNA loading was favored by potential electrostatic binding between the cationic polymer and the negatively charged DNA.

The zeta potential decreased as a function of the quantity of DNA adsorbed onto nanoparticles (Figures 1 and 2A), which reflects a higher loading for the higher polymer (*i.e.*, nanoparticles) concentration. The observed zeta potentials also depend on the preparation method. Nanoparticles prepared by double emulsion are more negatively charged than nanoparticles prepared by nanoprecipitation. Although a clear explanation has not been found for this observation, it could be due to spatial arrangement of DNA plasmid on the surface. Nevertheless, the zeta potential values reflect the DNA adsorption process for nanoparticles prepared by the same technique. Indeed, there were strong differences in zeta potential values for nanoparticles prepared by double emulsion: so, for double emulsion nanoparticles, zeta potential was a function of DNA adsorption, especially for the highest

polymer concentrations. On the other hand, there was no statistical difference in the amount of loaded DNA for nanoparticles prepared by nanoprecipitation (Figure 2A) and the zeta potential was fairly similar for each polymer concentration.

Quantification of DNA Loaded onto Nanoparticles

Determination of DNA loading efficiency

For the nanoparticles prepared by double emulsion, the loading efficiency was determined by UV absorbance. DNA was adsorbed onto the surface of nanoparticles from polymer concentrations as low as 30 µg/ml, and increased with polymer concentration up to 500 µg/ml. The results from the quantitative assay for the loading efficiency of DNA adsorbed onto nanoparticles showed that this depended on the type of polymer used. A higher loading was observed with Eudragit® RL nanoparticles compared with Eudragit® RS nanoparticles. DNA loading efficiency was more than 60% for 250 and 500 µg/ml Eudragit® RL nanoparticles concentration (Figure 1).

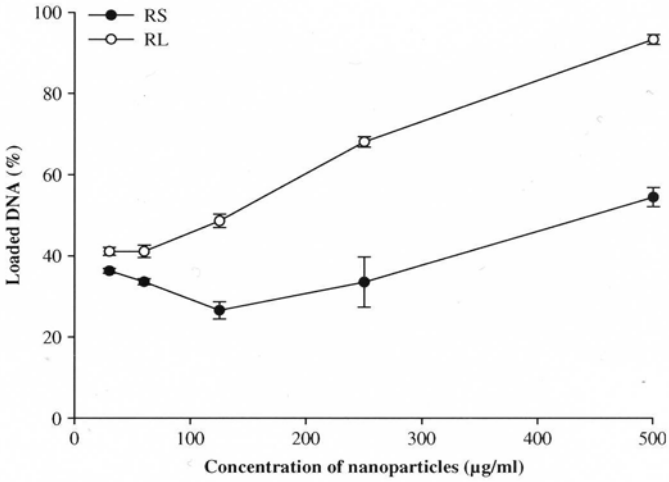


Figure 1: Loaded DNA as a function of "double emulsion" nanoparticles concentration (n=3 ± SD).

In preliminary trials with the double emulsion technique, we attempted to encapsulate DNA by dissolving it in 1 ml internal aqueous phase. Nanoparticles were easily manufactured but the DNA was totally degraded during the preparation steps, probably because of the high shear energy from sonication during the emulsification process. Therefore, we decided to prepare unloaded nanoparticles and then to allow the DNA to adsorb onto the nanoparticles surface under gentle stirring, thus preserving its integrity. Another advantage of the adsorption technique is that is easily applied to nanoparticles obtained by nanoprecipitation. Therefore, the same adsorption technique was used to bind DNA onto both types of nanoparticles, which was an advantage for comparing transfection as a function of particle size. Adsorption of DNA onto nanoparticles did not significantly change their diameter compared with unloaded particles (Table I). Although we observed some fluctuations in mean particle size with the amount of adsorbed DNA, there was no definite trend as a function of DNA loading. So it can be concluded that DNA adsorption has no (or limited) effect on particle size for a total of 4 µg added to the system.

Gel Electrophoresis

The complexation of DNA with nanoparticles prepared by nanoprecipitation was determined onto an agarose gel since it was not possible to separate these particles from the bulk medium by ultracentrifugation at 42,000 g. An alternative, semi-quantitative, method was chosen. The DNA plasmid was mixed with various amounts of nanoparticles and then subjected to electrophoresis on a 0.8% Tris-borate-EDTA agarose gel (Figure 2). As shown in Figure 2 B, increasing the

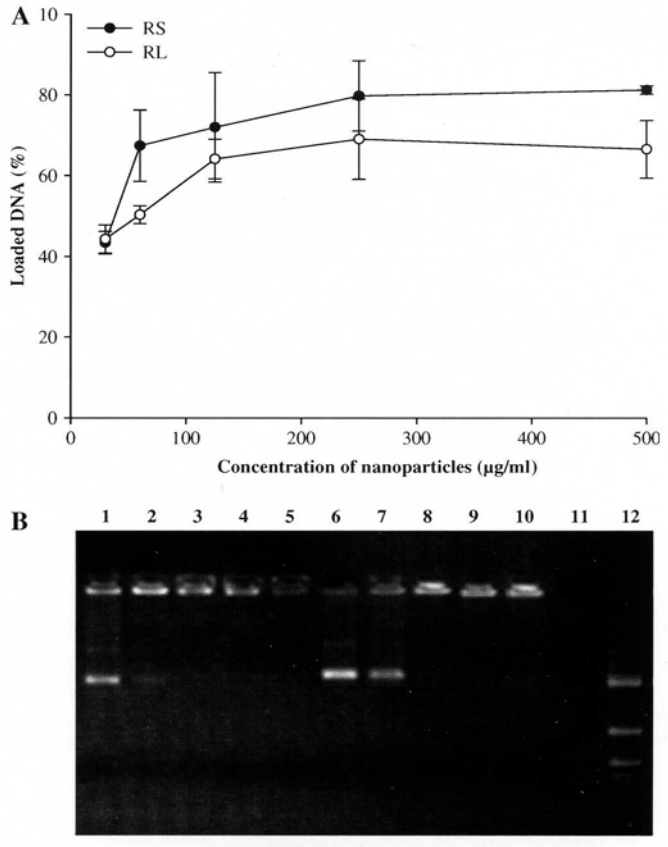


Figure 2: (**A**) DNA loading as a function of polymer concentration for nanoparticles prepared by nanoprecipitation (n=3 ± SD). (**B**) Agarose gel electrophoresis of DNA-loaded nanoparticles prepared by nanoprecipitation. (Lane 1-5) Eudragit® RS-DNA nanoparticles and (Lane 6-10) Eudragit® RL-DNA nanoparticles with different concentrations of nanoparticles 30, 60, 125, 250, 500 µg/ml, respectively. Lane 11 corresponds to unloaded nanoparticles and lane 12 corresponds to the size markers.

nanoparticle concentration for a fixed amount (4 μg) of DNA led to an increase in the amount of DNA bound to nanoparticles. Indeed for the first two lanes of each Eudragit® (lanes 1, 2 and 6, 7 for Eudragit® RS and RL, respectively), there were not enough nanoparticles to bind all the nucleic acid and some free DNA was able to migrate into the gel. Despite the higher charge of the Eudragit® RL nanoparticles, there was no statistical difference from Eudragit® RS nanoparticles with respect to the amount of DNA bound. The amount of DNA loading is also reflected in the zeta potential results (Figure 2).

Cell Viability

The cytotoxicity of Eudragit® RS and RL nanoparticles was determined using the MTT assay (Figure 3) in three cell lines over 24h (corresponding to the experimental time used for an *in-vitro* transfection). The viability of the three different cell lines was tested in the presence or absence of DNA-nanoparticles at various concentrations of polymer (*i.e.*, nanoparticles) prepared by nanoprecipitation. Cytotoxicity studies and transfection by nanoparticles prepared by nanoprecipitation were carried out

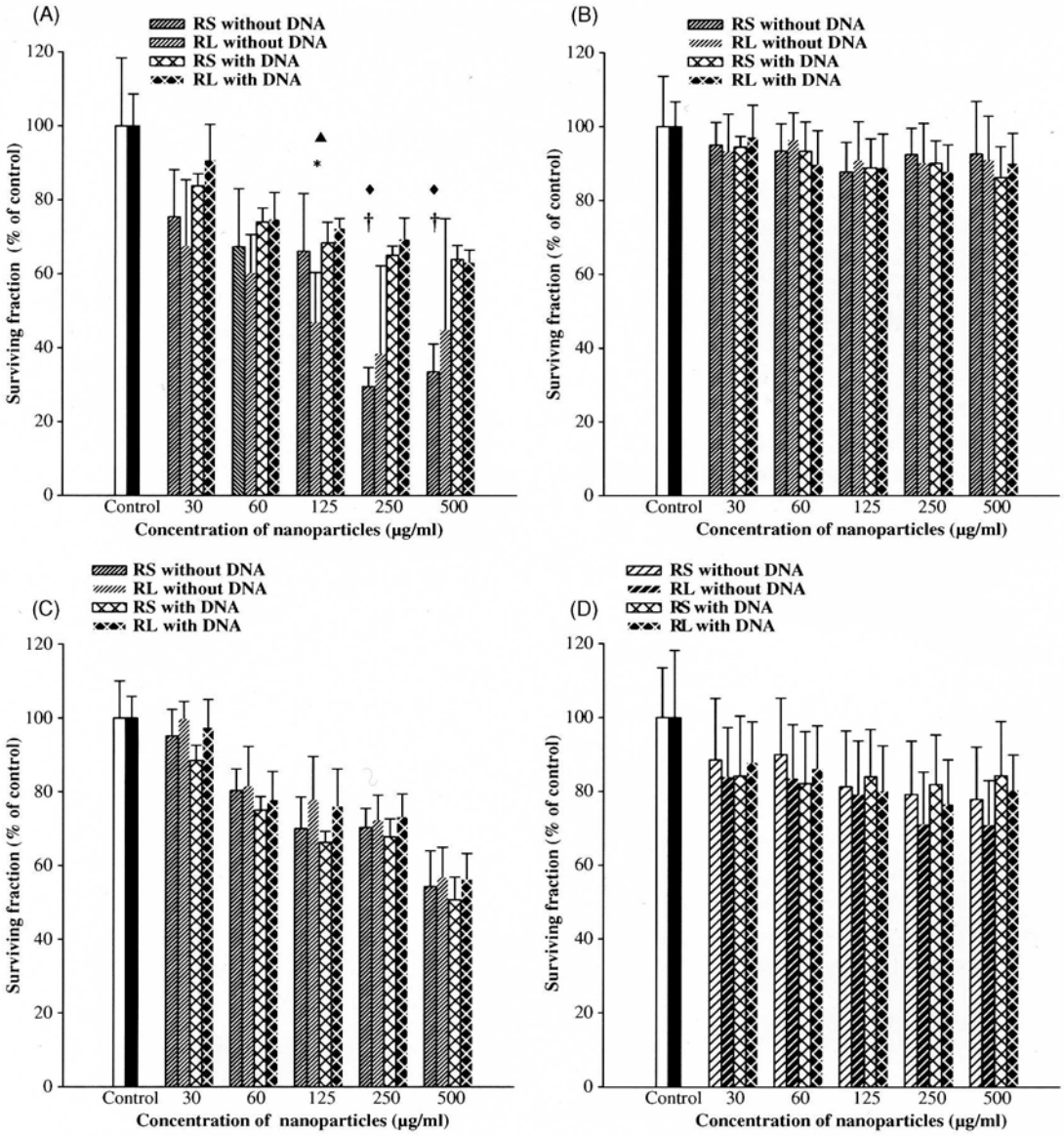


Figure 3: Cytotoxicity of nanoparticles prepared by nanoprecipitation. (**A**) in FaDu cells, (**B**) in MDA-MB 231 cells, (**C**) in MCF-7 cells. Cytotoxicity of nanoparticles prepared by the double emulsion technique: (**D**) in MCF-7 cells. Results are expressed as the fraction of surviving cells relative to untreated control (n=9 ± SD).

▲DNA-RL is statistically different from RL nanoparticle at $p < 0.05$. ♦DNA-RS is statistically different from RS nanoparticle at $p < 0.05$. *RL nanoparticle is statistically different from control at $p < 0.05$. † RS nanoparticle is statistically different from control at $p < 0.05$. ●DNA-nanoparticles "double emulsion" is statistically different from DNA-nanoparticles "nanoprecipitation" at $p < 0.05$. ǂ RS or RL "double emulsion" nanoparticles is statistically different from RS or RL "nanoprecipitation" at $p < 0.05$.

in three different cell lines (FaDu, MDA-MB 231 and MCF-7 cells) for three reasons: i) to evaluate the behaviour of different cancer cell lines with the new developed nanoparticles; ii) to determine whether MCF-7 cells, known to be easily transfected, have a different behaviour than other cell lines; iii) to compare the efficacy of transfection with nanoparticles between the invasive (MDA-MB231) and noninvasive (FaDu and MCF-7) cancer cells. Since nanoparticles prepared by the double emulsion technique were more difficult to obtain, they were only evaluated in MCF-7 cells, in comparison with nanoparticles prepared by nanoprecipitation, to investigate any size-related effect in a cell line supposed to offer high transfection rates. Cells incubated in culture medium alone (RPMI or DMEM) were used to obtain values for 100% viability.

Nanoparticles prepared by nanoprecipitation were found to be less toxic towards MDA-MB 231 and MCF-7 cells than towards FaDu cells (Figure 3A). DNA-loaded nanoparticles were less cytotoxic than nanoparticles without DNA for polymer concentrations between 125 to 500 µg/ml in FaDu cells, whatever the polymer type. In MDA-MB 231 cells, neither DNA-loaded nanoparticles nor nanoparticles without DNA were toxic, since the viability was maintained at approximately 90% of the control regardless of the polymer type and the concentration of nanoparticles (Figure 3B). Lower cytotoxicity was observed in MCF-7 cells with the particles prepared by the double emulsion than with those prepared by the nanoprecipitation technique (Figure 3D) (Figure 3).

Of the three cell lines studied with nanoparticles prepared by nanoprecipitation, FaDu cells appeared to be the most sensitive, whereas MDA-MB 231 cells displayed a higher surviving fraction, even for the highest nanoparticle concentration (500 µg/ml) leading to around 90% survival, compared with less than 50% for the FaDu cells. In FaDu cells, DNA adsorption decreased the overall toxicity with statistically significant differences at 250 and 500 µg/ml of Eudragit® RS nanoparticles. Such an observation could be related to the specific sensitivity of the cell line due to the increased polymer concentration, which was not observed in MDA-MB 231 cells. More neutral or even negative nanoparticles seem also to play a role in the decreased toxicity compared with the high positive values of unloaded nanoparticles. On the other hand, polymer concentration and zeta potential values did not affect viability in MDA-MB 231 cells. The results observed in MCF-7 were intermediate, with more than 50% viability for all conditions tested.

In the MCF-7 cell line, the cytotoxicity of nanoparticles prepared by the double emulsion technique could be compared with that of those prepared by nanoprecipitation. Figure 3D shows that the overall surviving fraction was higher with "double emulsion" nanoparticles than "nanoprecipitation" nanoparticles. For both types of nanoparticles, there were no statistical differences between different concentrations of polymer between 30 and 500 µg/ml.

These results highlight the relationship between size and toxicity, since "large" nanoparticles (range 300-400 nm) were much less toxic than "small" nanoparticles (around 50 nm). This could be attributed to a deleterious action of the polymer after phagocytosis or an effect of many smaller nanoparticles coating the cell surface and preventing exchanges between the nutrient medium and the cells. The comparison also demonstrated that PVA (the surfactant used in the double emulsion technique) did not have any deleterious action on cells despite previous reports (44). Comparison of the effect of unloaded and DNA-loaded nanoparticles showed that there was no significant difference in their impact on cell viability except in the case of FaDu cells in which the DNA-loaded nanoparticles at 125, 250 and 500 µg/ml were significantly less toxic than unloaded nanoparticles at the same polymer concentration. This was not unexpected since Cherng *et al.*, found that complexes of pDNA with (poly(2-dimethylamino)ethyl methacrylate) were less toxic than the cationic polymer alone (45). The mechanism of cytotoxicity caused by polycations is not yet fully understood. Whether their cytotoxic effects are mainly mediated by interactions with cell membranes or by cellular uptake and subsequent activation of intracellular signal transduction pathways, is still being debated in the literature. Furthermore, no investigations have addressed the question of whether this cytotoxicity induced by polycations is apoptotic or necrotic in nature (46).

Transfection Efficiency

Transfection was studied in the three cell lines. The transfection efficiency was quantified by a flow cytometry assay. The commercial cationic liposome-based reagent, Lipofectamine 2000® (lipofectamine), known to provide high transfection efficiency and a high level of transgene expression in numerous mammalian cell types *in vitro* (47) was chosen as a positive control.

For nanoparticles prepared by nanoprecipitation, the transfection level was the highest in FaDu cells, whereas MCF-7 cells showed the lowest rate of transfection. In FaDu cells, the rate of transfection of the lipofectamine was between 2- and 3 fold higher than the "nanoprecipitation" nanoparticles. These nanoparticles provided a rate of transfection of around 6% for both type of polymer, at all polymer concentrations. At higher concentrations (250 and 500 µg/ml) the rates of transfection decreased slightly. This phenomenon was probably the result of the toxicity observed earlier for this cell line at the highest concentrations.

In MDA-MB 231 cells, the rate of transfection of the lipofectamine was lower (7%) than in FaDu cells (15%). With nanoparticles, the rate of transfection was slightly lower than with lipofectamine. However, it should be noticed that Eudragit® RL nanoparticles at a concentration of 500 µg/ml showed a transfection rate (7%) that was not not statistically different from that of the lipofectamine control. So, it can

be deduced that transfection rate is not correlated to cell survival, since nanoparticles have almost no toxic effect on MDA-MB 231 cells. Furthermore, despite a larger number of viable cells, the transfection rate was lower than in FaDu cells, suggesting that transfection efficiency could be directly related to the cell type.

In MCF-7 cells, the rates of transfection of both nanoparticles and lipofectamine were found to be lower than in the other two cell lines. The rate of transfection was similar for both lipofectamine and nanoparticles and there were no statistical differences between the two polymers and between different concentrations. Surprisingly, the increased toxicity observed at a concentration of 500 µg/ml nanoparticles was not correlated with a lower transfection rate. Despite their low transfection efficiency, MCF-7 cells were selected for testing the "double emulsion" nanoparticles, because the criterion was to have a cell line presenting the same efficiency for the lipofectamine control and the nanoparticles in order to highlight the influence of the particle diameter (Figure 4).

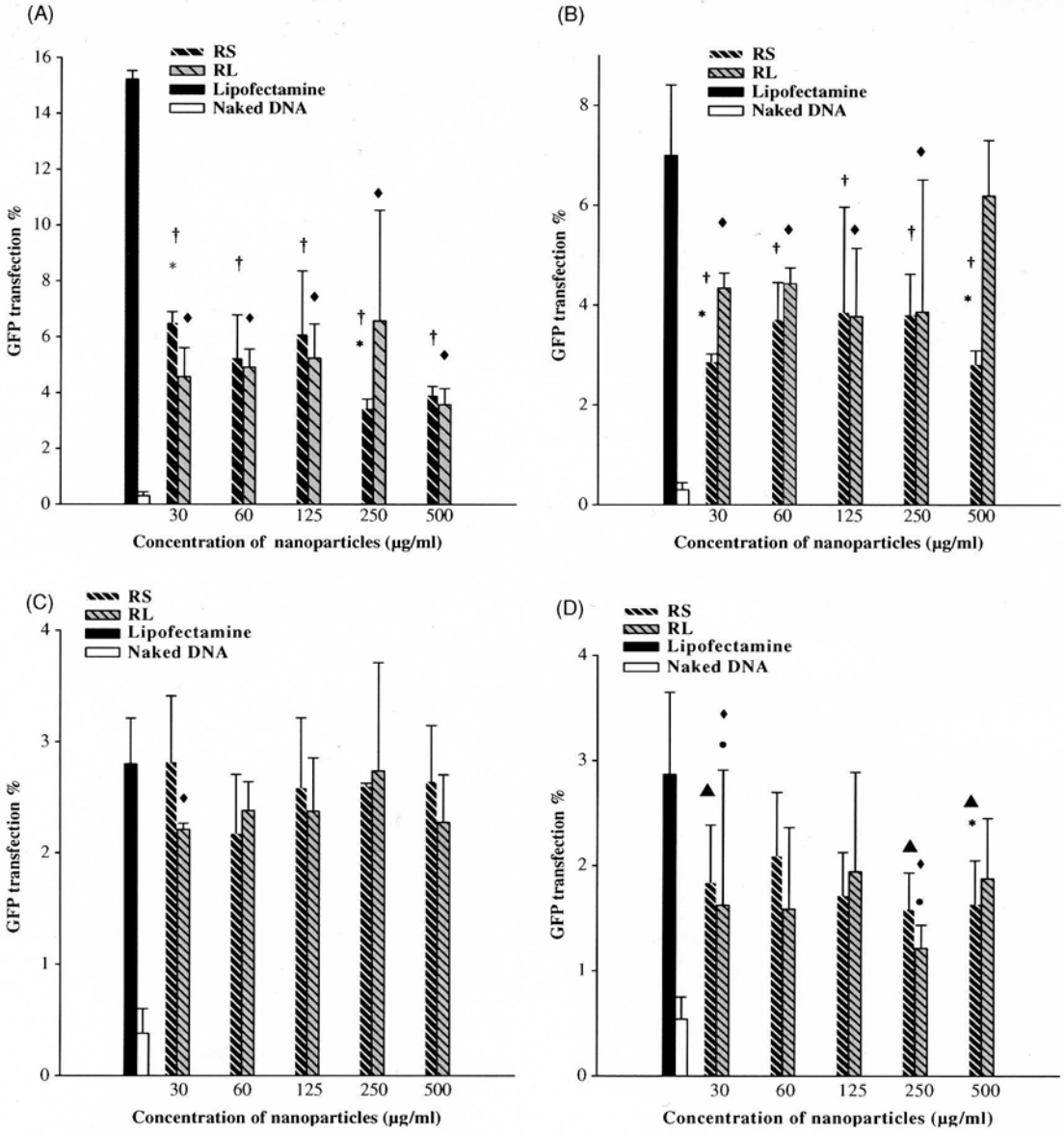


Figure 4: GFP-expressing cell population (%) in FADU (A), MDA-MB 231 (B) and MCF-7 (C, D) cells measured by flow cytometry 24h after GFP gene transfer using Eudragit® RS, RL prepared by nanoprecipitation (figure A, B, C) or by double emulsion (figure D), Lipofectamine, and naked DNA. Results are presented as mean values of at least three independent experiments (n=3 ± SD).
† DNA-RS is statistically different from lipofectamine at $p < 0.05$. ♦ DNA-RL RS is statistically different from lipofectamine at $p < 0.05$. * DNA-RS RS is statistically different from DNA-RL "nanoprecipitation" nanoparticles at $p < 0.05$. ▲ DNA-RS "double emulsion" nanoparticles is statistically different from DNA-RS "nanoprecipitation" nanoparticles at $p < 0.05$. ● DNA-RL "double emulsion" nanoparticles is statistically different from DNA-RL "nanoprecipitation" nanoparticles at $p < 0.05$.

The transfection efficiency of nanoparticles prepared by nanoprecipitation was in the range 4 to 7% in both FaDu and MDA-MB 231 cells. Only MCF-7 cells were transfected with nanoparticles prepared by double emulsion (Figure 4D) and by nanoprecipitation (Figure 4C); the transfection efficiencies were between 2 and 4%; however, nanoparticles prepared by nanoprecipitation were significantly more efficient than nanoparticles prepared by the double emulsion technique, as shown in Figure 4D. Nevertheless, this is only a trend since there were no statistical differences between 30 to 500 µg/ml of nanoparticles for both types of polymer. Again, the toxicity results with "double emulsion" nanoparticles seem contradictory with the transfection rate, since MCF-7 cells were more sensitive to "nanoprecipitation" than "double emulsion" nanoparticles especially for the highest concentration (500 µg/ml). The small differences in transfection rate could be due to particle size. Indeed, "smaller" nanoparticles (around 50 nm) would be expected to be more efficient at transfecting than "larger" nanoparticles (range 300-400 nm).

For example, Prahba *et al.*, 2002, have demonstrated that small PLGA nanoparticles (around 95-130 nm) allowed a better transfection than the same nanoparticles of 300-400 nm on COS-7 and HEK-293 cell lines (28). Overall, Eudragit polycationic nanoparticles did not demonstrate a higher transfection rate than the lipofectamine control. Neither zeta potential nor DNA loading nor even particle size was found to have any dramatic effect on transfection efficiency in any of the 3 cell lines studied.

Conclusion

In this study, we investigated two methods for preparing cationic Eudragit® RS and RL nanoparticles as non-viral vectors. The double emulsion and nanoprecipitation techniques were used successfully to produce cationic nanoparticles designed to enhance the electrostatic interaction between DNA and the cell membrane. The mean particle size of the nanoparticle was smaller when nanoparticles were made by nanoprecipitation. The cationic Eudragit nanoparticles obtained formed complexes with DNA and could be used for cell transfection. In an *in-vitro* transfection study using three cell lines, Eudragit nanoparticles complexed with DNA gave GFP expression.

Aknowledgements

This work was supported by Ligue Contre le Cancer, comité de Moselle, France. The authors also thank Dr G. Barratt for her help and support in reviewing the revised manuscript.

References

1. Roques, C., Fattal, E.Fromes, Y. Comparison of toxicity and transfection efficiency of amphiphilic block copolymers and polycationic polymers in striated muscles. *J Gene Med 11*, 240-249 (2009).
2. Yiu, H. H., McBain, S. C., Lethbridge, Z. A., Lees, M. R.Dobson, J. Preparation and characterization of polyethylenimine-coated Fe(3) O(4)-MCM-48 nanocomposite particles as a novel agent for magnet-assisted transfection. *J Biomed Mater Res A*, (2009).
3. Kay, M. A., Glorioso, J. C., Naldini, L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med 7*, 33-40 (2001).
4. Thomas, C. E., Ehrhardt, A., Kay, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet 4*, 346-358 (2003).
5. Leong, K. W., Mao, H. Q., Truong-Le, V. L., Roy, K., Walsh, S. M., August, J. T. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J Control Release 53*, 183-193 (1998).
6. Masotti, A., Mossa, G., Cametti, C., Ortaggi, G., Bianco, A., Grosso, N. D., Malizia, D., Esposito, C. Comparison of different commercially available cationic liposome-DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloids Surf B Biointerfaces 68*, 136-144 (2008).
7. Higashi, T., Khalil, I. A., Maiti, K. K., Lee, W. S., Akita, H., Harashima, H., Chung, S. K. Novel lipidated sorbitol-based molecular transporters for non-viral gene delivery. *J Control Release 136*, 140-147 (2009).
8. Yingyongnarongkul, B. E., Radchatawedchakoon, W., Krajarng, A., Watanapokasin, R., Suksamrarn, A. High transfection efficiency and low toxicity cationic lipids with aminoglycerol-diamine conjugate. *Bioorg Med Chem 17*, 176-188 (2009).
9. Li, L., Nie, Y., Ye, D., Cai, G. An easy protocol for on-chip transfection of COS-7 cells with a cationic lipid-based reagent. *Lab Chip 9*, 2230-2233 (2009).
10. Wu, H., Ramachandran, C., Bielinska, A. U., Kingzett, K., Sun, R., Weiner, N. D.Roessler, B. J. Topical transfection using plasmid DNA in a water-in-oil nanoemulsion. *Int J Pharm 221*, 23-34 (2001).
11. Wang, Y., Wang, L. S., Goh, S. H.Yang, Y. Y. Synthesis and characterization of cationic micelles self-assembled from a biodegradable copolymer for gene delivery. *Biomacromolecules 8*, 1028-1037 (2007).
12. Zhang, X. Q., Intra, J.Salem, A. K. Comparative study of poly (lactic-co-glycolic acid)-poly ethyleneimine-plasmid DNA microparticles prepared using double emulsion methods. *J Microencapsul 25*, 1-12 (2008).
13. Green, J. J., Zhou, B. Y., Mitalipova, M. M., Beard, C., Langer, R., Jaenisch, R.Anderson, D. G. Nanoparticles for gene transfer to human embryonic stem cell colonies. *Nano Lett 8*, 3126-3130 (2008).
14. Yang, F., Green, J. J., Dinio, T., Keung, L., Cho, S. W., Park, H., Langer, R., Anderson, D. G. Gene delivery to human adult and embryonic cell-derived stem cells using biodegradable nanoparticulate polymeric vectors. *Gene Ther 16*, 533-546 (2009).
15. De Smedt, S. C., Demeester, J., Hennink, W. E. Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm Res 17*, 113-26 (2000).
16. Park, T. G., Jeong, J. H., Kim, S. W. Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev 58*, 467-486 (2006).
17. Gebhart, C. L., Kabanov, A. V. Perspectives on Polymeric Gene Delivery. *J Bioact and Compat Pol 18*, 147-166 (2003).
18. Lee, M., Kim, S. W. Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery. *Pharm Res 22*, 1-10 (2005).
19. Mansouri, S., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E.Fernandes, J. C. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *Eur J Pharm Biopharm 57*, 1-8 (2004).
20. Kichler, A. Gene transfer with modified polyethylenimines. *J Gene Med 6 Suppl 1*, S3-10 (2004).
21. Vicennati, P., Giuliano, A., Ortaggi, G., Masotti, A. Polyethylenimine in medicinal chemistry. *Curr Med Chem 15*, 2826-2839 (2008).
22. Merlin, J. L., N'Doye, A., Bouriez, T., Dolivet, G. Polyethylenimine Derivatives as Potent Nonviral Vectors for Gene Transfer. *Drug News Perspect 15*, 445-451 (2002).

23. Ndoye, A., Dolivet, G., Hogset, A., Leroux, A., Fifre, A., Erbacher, P., Berg, K., Behr, J. P., Guillemin, F.Merlin, J. L. Eradication of p53-mutated head and neck squamous cell carcinoma xenografts using nonviral p53 gene therapy and photochemical internalization. *Mol Ther 13*, 1156-1162 (2006).
24. Christiaens, B., Dubruel, P., Grooten, J., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Schacht, E., Rosseneu, M. Enhancement of polymethacrylate-mediated gene delivery by Penetratin. *Eur J Pharm Sci 24*, 525-537 (2005).
25. Panyam, J., Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev 55*, 329-347 (2003).
26. Vasir, J. K.Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev 59*, 718-728 (2007).
27. Kneuer, C., Ehrhardt, C., Bakowsky, H., Kumar, M. N., Oberle, V., Lehr, C. M., Hoekstra, D.Bakowsky, U. The influence of physicochemical parameters on the efficacy of non-viral DNA transfection complexes: a comparative study. *J Nanosci Nanotechnol 6*, 2776-82 (2006).
28. Prabha, S., Zhou, W. Z., Panyam, J., Labhasetwar, V. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J Pharm 244*, 105-115 (2002).
29. Brannon-Peppas, L., Ghosn, B., Roy, K., Cornetta, K. Encapsulation of nucleic acids and opportunities for cancer treatment. *Pharm Res 24*, 618-627 (2007).
30. Singh, M., Briones, M., Ott, G., O'Hagan, D. Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA 97*, 811-816 (2000).
31. Esposito, E., Sebben, S., Cortesi, R., Menegatti, E., Nastruzzi, C. Preparation and characterization of cationic microspheres for gene delivery. *Int J Pharm 189*, 29-41 (1999).
32. Basarkar, A., Devineni, D., Palaniappan, R., Singh, J. Preparation, characterization, cytotoxicity and transfection efficiency of poly(DL-lactide-co-glycolide) and poly(DL-lactic acid) cationic nanoparticles for controlled delivery of plasmid DNA. *Int J Pharm 343*, 247-254 (2007).
33. Kasturi, S. P., Sachaphibulkij, K., Roy, K. Covalent conjugation of polyethyleneimine on biodegradable microparticles for delivery of plasmid DNA vaccines. *Biomaterials 26*, 6375-6385 (2005).
34. Ando, S., Putnam, D., Pack, D. W., Langer, R. PLGA microspheres containing plasmid DNA: preservation of supercoiled DNA via cryopreparation and carbohydrate stabilization. *J Pharm Sci 88*, 126-130 (1999).
35. Prabha, S., Labhasetwar, V. Critical determinants in PLGA/PLA nanoparticle-mediated gene expression. *Pharm Res 21*, 354-364 (2004).
36. Fessi, H., Piusieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm 55*, (1989).
37. Bodmeier, R., Chen, H., Tyle, P., Jarosz, P. Spontaneous formation of drug-containing acrylic nanoparticles. *J Microencapsul 8*, 161-170 (1991).
38. Alex, R., Bodmeier, R. Encapsulation of water-soluble drugs by a modified solvent evaporation method. I. Effect of process and formulation variables on drug entrapment. *J Microencapsul 7*, 347-355 (1990).
39. Minig, V., Kattan, Z., van Beeumen, J., Brunner, E., Becuwe, P. Identification of DDB2 Protein as a Transcriptional Regulator of Constitutive SOD2 Gene Expression in Human Breast Cancer Cells. *J Biol Chem 284*, 14165-14176 (2009).
40. Hoffart, V., Ubrich, N., Simonin, C., Babak, V., Vigneron, C., Hoffman, M., Lecompte, T., Maincent, P. Low molecular weight heparin-loaded polymeric nanoparticles: formulation, characterization, and release characteristics. *Drug Dev Ind Pharm 28*, 1091-1099 (2002).
41. Cortesi, R., Mischiati, C., Borgatti, M., Breda, L., Romanelli, A., Saviano, M., Pedone, C., Gambari, R., Nastruzzi, C. Formulations for natural and peptide nucleic acids based on cationic polymeric submicron particles. *AAPS J 6*, 10-21 (2004).
42. Kim, J. S., Kim, B. I., Maruyama, A., Akaike, T., Kim, S. W. A new non-viral DNA delivery vector: the terplex system. *J Control Release 53*, 175-182 (1998).
43. Thomas, M., Klibanov, A. M. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl Microbiol Biotechnol 62*, 27-34 (2003).
44. Wang, C. C., Lu, J. N., Young, T. H. The alteration of cell membrane charge after cultured on polymer membranes. *Biomaterials 28*, 625-631 (2007).
45. Cherng, J. Y., van de Wetering, P., Talsma, H., Crommelin, D. J., Hennink, W. E. Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharm Res 13*, 1038-1042 (1996).
46. Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Kissel, T. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials 24*, 1121-1131 (2003).
47. Zhang, S., Zhao, B., Jiang, H., Wang, B., Ma, B. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J Control Release 123*, 1-10 (2007).

Received: June 8, 2009; Revised: August 26, 2009; Accepted: September 1, 2009

Association des nanoparticules d'Eudragit® RS ou RL avec la technique d'internalisation photochimique : tentative d'amélioration de l'efficacité de transfection

2 ASSOCIATION DES NANOPARTICULES D'EUDRAGIT® RS OU RL AVEC LA TECHNIQUE D'INTERNALISATION PHOTOCHIMIQUE : TENTATIVE D'AMÉLIORATION DE L'EFFICACITÉ DE TRANSFECTION.

2.1 INTRODUCTION

Parmi les vecteurs non viraux élaborés actuellement pour des essais de thérapie génique, les nanoparticules de polymères présentent de multiples avantages dans la délivrance des médicaments [166]. Dans le chapitre précédent, nous avons décrit le développement et l'évaluation de nouveaux « outil-vecteur de gène » basés sur des nanoparticules constituées de polymères méthacryliques polycationiques (Eudragit® RS et RL), sur lesquelles était adsorbé un gène rapporteur. En effet, ce gène codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP) permettait, de manière relativement aisée, d'évaluer l'efficacité de la transfection en suivant l'expression de la protéine pour laquelle il code par cytométrie en flux. Ces nanoparticules ont tout d'abord été caractérisées d'un point de vue physico-chimique en termes de taille, de potentiel zêta, et de la quantité d'ADN adsorbée à la surface. L'efficacité de la transfection de ces nanoparticules a été ensuite testée sur plusieurs lignées cellulaires classiquement utilisées en transfection mais différentes de par leur métabolisme plus ou moins rapide (cellules migratrices ou non) et par conséquent de par leur aptitude à être transfectées. Ainsi, les résultats les plus intéressants de transfection à l'aide de ce nouvel « outil-vecteur d'ADN » ont été obtenus avec la lignée cellulaire FaDu. Des taux de 6 à 7 % de transfection ont pu être détectés sur les cellules FaDu, de même ordre que ceux obtenus avec la lipofectamine. Néanmoins, ces niveaux de transfection nécessitent d'être encore améliorés et l'association de ces vecteurs méthacryliques avec la technique d'internalisation photochimique, connue pour faciliter l'entrée des vecteurs dans les cellules, fait l'objet des essais exposés dans ce chapitre. Comme nous l'avons décrit dans la revue bibliographique, l'internalisation photochimique

(PCI) est une technologie physicochimique permettant la libération spécifique de macromolécules dans les cellules [163]. Son utilisation a ainsi augmenté significativement l'efficacité de la transfection de la GFP sur différents types cellulaires (de 2% sans PCI à 50% avec la PCI selon le types cellulaires) [167], mais nécessite néanmoins une mise au point préalable des paramètres d'application, tels que la nature et la concentration en photosensibilisant ou la nature et le temps d'exposition à la lumière.

Dans ce chapitre, nous exposons donc la mise en place d'une technique de PCI sur les cellules FaDu ainsi que les essais de transfection par les nanoparticules d'Eudragit associées à cette technique.

2.2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.2.1 TECHNIQUE D'INTERNALISATION PHOTOCHIMIQUE (PCI) ET OPTIMISATION DES PARAMÈTRES

L'optimisation des conditions de PCI sur les cellules FaDu dont nous disposons a été effectuée selon la même procédure que celle préalablement exposée par Ndoye et coll. (2004) [168]. Pour cela, nous avons réalisé une étude de transfection avec des complexes constitués de polyéthylènimine (PEI), et d'ADN. Il s'agissait en effet de se placer dans des conditions certaines de transfection : le pouvoir transfectant de la PEI n'est plus à démontrer et s'élève de 20 à 100% selon les études [76, 168-170]. Le ratio « nombre de moles d'Azote sur le nombre de moles de Phosphate » (ratio N/P, caractérisant l'adsorption de l'ADN) était dans notre étude, égal à 5. Des études de transfection avec ces complexes PEI/ADN sur les cellules FaDu ont donc été réalisées en association à la technique de PCI. Le photosensibilisant utilisé est le mésotétraphénylporphine disulfonée ($TPPS_{2a}$). Le $TPPS_{2a,}$ mésophénylporphyrine contenant deux groupements sulfonés adjacents, a l'avantage d'avoir un fort taux d'incorporation dans les tissus tumoraux donc un intérêt pour une utilisation en photochimiothérapie. Il est également

approprié à une utilisation en tant que photosensibilisateur pour une internalisation photochimique de macromolécules. Toutefois, le désavantage principal de l'utilisation du $TPPS_{2a}$ à des fins cliniques est sa faible absorbance de la lumière rouge. En effet, une limitation majeure à l'utilisation clinique de tous les dérivés de porphyrine connus est que la plus longue longueur d'onde de lumière à laquelle ils répondent a une absorbance relativement faible se situe à environ 620 à 630 nm. A de telles longueurs d'onde, la lumière est seulement capable de pénétrer d'une courte distance dans des tissus vivants et est donc incapable d'atteindre des cellules ou des tissus en profondeur, par exemple des cellules tumorales. Plusieurs concentrations de ce photosensibilisant (0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 µg/ml) et plusieurs durées d'exposition à la lumière (λ= 420 nm) [165] (15, 30 et 60 secondes) ont été évaluées de la manière suivante, afin de déterminer les conditions optimales de PCI. Brièvement, les cellules FaDu (passage 70 à 80) ont été ensemencées dans des plaques 24 puits à une concentration de 5.10^4 cellules/puits, dans du milieu RPMI complet 10% sérum de veau fœtal (SVF, Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France), 1% antibiotiques, 1% L-Glutamine (Invitrogen, Illkirch, France). Les cellules ont été ainsi incubées pendant 24h (à 37°C et dans une atmosphère à 5% CO_2). Le milieu de culture a alors été éliminé, et les cellules ont été lavées 2 fois avec du tampon phosphate (PBS, Gibco, Invitrogen, Illkirch, France). Les différentes concentrations de $TPPS_{2a}$ (0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 µg/ml de milieu RPMI à 2% SVF) ont été déposées sur les cellules incubées ainsi pendant 18h, à 37°C, dans une atmosphère à 5% CO2. Le photosensibilisant, très sensible à la lumière, implique des manipulations à l'obscurité.

Les complexes PEI/ADN (N/P=5 ; 4 µg ADN, 100µl finaux dans du glucose 5%) ont été préparés extemporanément et déposés dans les puits pendant 2h (37°C, 5% CO2). Les cellules ont ensuite été irradiées pendant différents durées (15, 30, 60 secondes) à l'aide d'un banc de lumière Lumisource® (PCI Biotech, Oslo, Norway) contenant 4 tubes fluorescents, conçu pour fournir une lumière homogène émettant dans le bleu (pic à 420 nm et d'intensité homogène 10

± 0,1 mW/cm^2). Après 2 heures d'incubation (37°C, 5% CO_2), 500µl de milieu RPMI 20% SVF ont été ajoutés aux cellules. Après 24 heures d'incubation et lavage au PBS, l'intensité de fluorescence de 10.000 cellules a finalement été mesurée, avec un cytomètre de flux FACS Calibur® et analysée avec un logiciel Cell Quest® (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France). Les taux de transfection, obtenus pour les différents paramètres de PCI et sans PCI, ont été exprimés en pourcentage de cellules comptées (n=4).

2.2.2 FABRICATION DES NANOPARTICULES « OUTIL-VECTEUR D'ADN ».

Les nanoparticules d'Eudragit® RS et RL ont été préparées par la méthode de nanoprécipitation [171, 172] décrite brièvement dans le chapitre précédent [173]. Les particules sans ADN ainsi formulées présentaient une taille d'environ 50nm et un potentiel zêta de + 50 mV.

L'ADN adsorbé sur ces nanoparticules est un ADN plasmidique porteur du gène de la GFP, permettant une détection aisée de la protéine pour laquelle il code par cytométrie en flux

L'adsorption de l'ADN à la surface des nanoparticules s'effectue par l'établissement de nombreuses interactions électrostatiques entre les groupements phosphate de l'ADN et les groupements ammonium quaternaires des Eudragit® [174]. Ainsi, une quantité fixe de 4 µg d'ADN a été mise en présence à température ambiante, pendant 30 min, dans une solution de glucose à 5%, avec différentes concentrations de nanoparticules d'Eudragit® RS ou RL (30, 60, 125, 250, 500 µg/ml).

2.2.3 CYTOTOXICITÉ DES NANOPARTICULES D'EUDRAGIT® ASSOCIÉES À LA PCI SUR LES CELLULES FADU.

La cytotoxicité des nanoparticules associée à la PCI a été déterminée à l'aide du test MTT. Ce test est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire par la succinate déshydrogénase mitochondriale le (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2, 5-bromure diphenyltetrazolium) soluble, en formazan qui est un produit insoluble. La même procédure que celle décrite dans le chapitre précédent a été effectuée. Les cellules FaDu ont été ensemencées 24 h à 5.10^4 cellules/puits (plaques 24 puits), lavées à deux reprises avec du PBS, incubées pendant 18h avec le photosensibilisant $TPPS_{2a}$ à une concentration de 0,3µg/ml et mises en contact des nanoparticules/vecteurs d'ADN (100µl dans du glucose 5%, 4µg d'ADN) dans du milieu RPMI sans sérum (0% SVF, 1% antibiotiques, 1% L-glutamine). Différentes concentrations de nanoparticules (30, 60, 125, 250, 500 µg/ml) ont été testées. Après 4h d'incubation, du milieu RPMI 20% SVF a été déposé dans chaque puits. Après 24h d'incubation, le réactif MTT a été ajouté à la concentration de 2,5 mg/ml pour 4h d'incubation. Les cristaux de formazan formés ont été dissout dans une solution aqueuse de SDS 25% avant lecture de l'absorbance à 570 nm. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été déterminé par rapport à l'absorbance du témoin (cellules non traitées, sans nanoparticules et PCI ; n= 9).

2.2.4 TRANSFECTION DES CELLULES FADU PAR LES NANOPARTICULES D'EUDRAGIT® ASSOCIÉES À L'INTERNALISATION PHOTOCHIMIQUE.

Le protocole de transfection est basé sur la même procédure que le protocole d'évaluation de la cytotoxicité (*Figure 19*). Les cellules FaDu ont été préparées de la même manière. Après 2h d'incubation avec les nanoparticules-vecteurs d'ADN aux différentes concentrations testées, les cellules ont été irradiées pendant 30 secondes avec la source lumineuse (Lumisource®) décrite précédemment. Après 2h d'incubation (37°C, 5% CO_2), 0,5 ml

de milieu enrichi en sérum (20% de SVF) a été ajouté dans chaque puits. Après 24h d'incubation à 37°C, les cellules ont été lavées, incubées avec de la trypsine / EDTA pendant 5 min à 37°C, .et récupérées par centrifugation à 1500 tr / min pendant 10 min. L'intensité de fluorescence moyenne de 10.000 cellules individuelles a été mesurée avec un cytomètre de flux FACS Calibur® et analysées avec un logiciel Cell Quest® (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France).

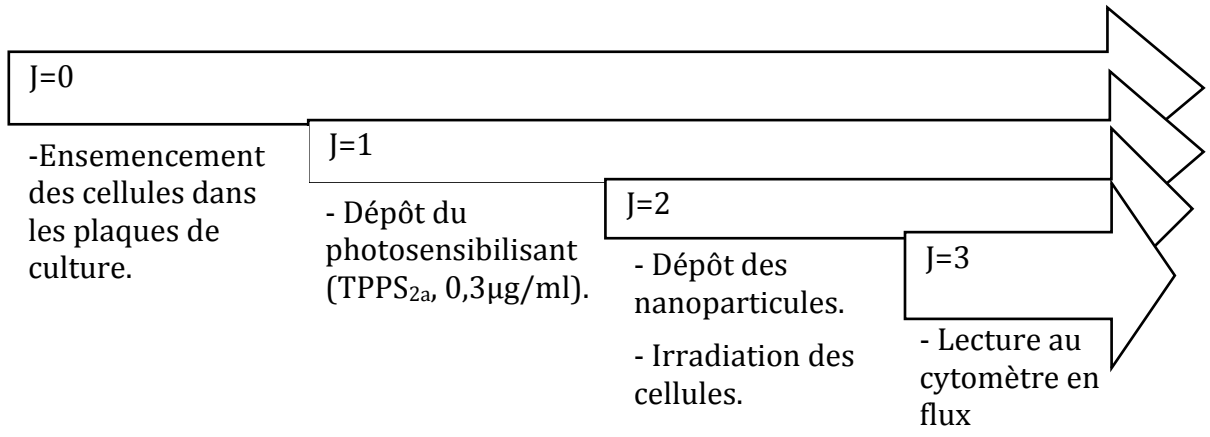


Figure 19: Schéma chronologique des manipulations lors de la transfection avec PCI.

2.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION.

2.3.1 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE LA TECHNIQUE DE PCI SUR LES CELLULES FADU.

De nombreuses études ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité de transfert de gènes à partir de vecteurs non-viraux en couplage avec la PCI. Dans notre étude, nous avons évalué l'impact de la PCI sur l'efficacité du transfert de gènes par des nanoparticules d'Eudragit® RS et RL sur des cellules FaDu. L'utilisation de la technique de PCI sur les cellules FaDu a fait l'objet d'une étude par Ndoye et coll. (2004) [168].

La concentration en photosensibilisant et le temps d'exposition à la lumière ont été optimisés. Ces auteurs ont montré que lorsque les cellules sont transfectées avec du polyethylenimine (PEI) ou du PEI-glucosylé, puis ensuite exposées au $TPPS_{2a}$, la cytotoxicité varie selon la concentration du $TPPS_{2a}$ et la dose de lumière dans les deux lignées cellulaires qu'ils ont étudiées. Les conditions optimales de transfection dans cette étude étant de 0,1 µg/ml de $TPPS_{2a}$ et de 30 secondes d'irradiation pour les cellules FaDu. Cependant, nous avons tenu à vérifier l'efficacité du $TPPS_{2a}$ sur la transfection des cellules FaDu. Le $TPPS_{2a}$ est un photosensibilisant amphiphile qui se localise préférentiellement dans la membrane cytoplasmique des cellules, et est ensuite internalisé dans la membrane de l'endosome. Dans l'étude de Ndoye et coll., les résultats obtenus sur les cellules FaDu avec le $TPPS_{2a}$ sont de 44% d'expression de la GFP après 48h de transfection. Nous avons donc fait varier la concentration en $TPPS_{2a}$ de 0,05 à 0,5 µg/ml, ainsi que le temps de présence à la lumière des cellules (15 à 60 secondes à la lumière bleue émettant à la longueur d'onde de 420 nm). Pour permettre une visualisation plus aisée de la transfection, des complexes PEI/ADN codant pour la GFP ont été préparés. Ces complexes ont été utilisés dans les études de Ndoye et coll. (2004), Maurice-Duelli et coll. (2004), et Prasmikaite et coll. (2000) [168, 175, 176]. Ils sont formés sur la base d'interactions électrostatiques entre les groupements amines (N) de la PEI et les groupements phosphate (P) de l'ADN : ce qui défini le rapport N/P, caractéristique des complexes polymères cationiques / ADN. Nous avons choisi d'utiliser le rapport N/P=5 car le taux de transfection du complexe PEI/ADN (seul, sans PCI) est d'environ 40%, ce qui permet de mettre en évidence une amélioration de l'efficacité de transfection. Les résultats obtenus sont exposés *Figure 20.* Les variables étudiées sont la quantité de photosensibilisant déposée sur les cellules, ainsi que la durée d'exposition à la lumière.

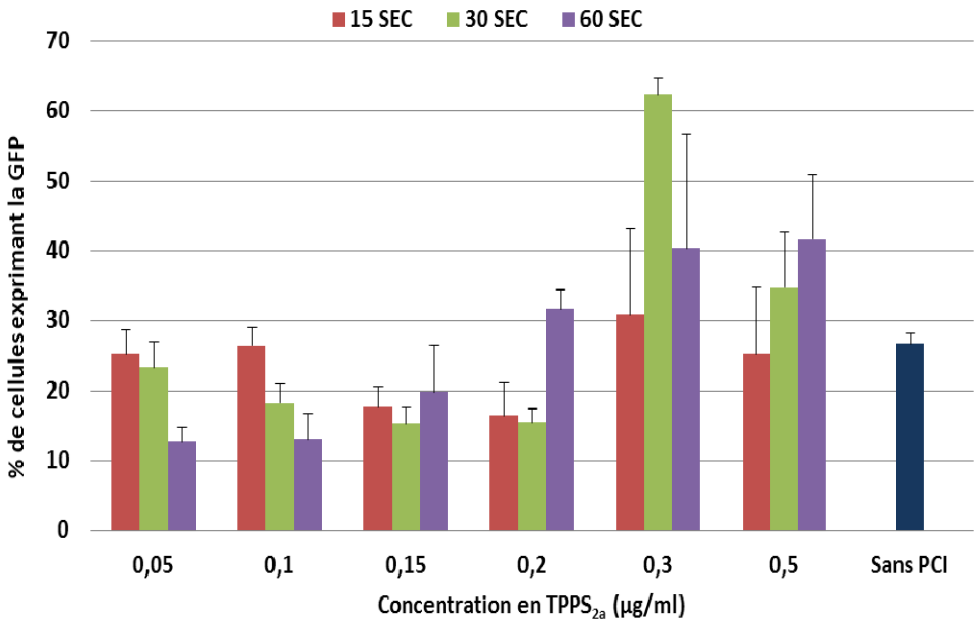


Figure 20 : Expression du taux de transfection du gène GFP en fonction de la quantité de photosensibilisant et du temps d'irradiation (moyenne ± écart-type ; n=9).

Les pourcentages de cellules transfectées les plus élevés ont été obtenus pour les concentrations en photosensibilisants de 0,3 et 0,5 µg/mL : selon le temps d'exposition à la lumière, 25 à 60% de transfection ont alors été obtenus. Le meilleur taux de transfection que nous ayons obtenu a été retrouvé pour une concentration en $TPPS_{2a}$ de 0,3 µg/ml et pour une exposition à la lumière de 30 secondes. Nous utiliserons donc ces dernières conditions pour la suite de notre étude.

Par rapport aux résultats décrits dans la littérature sur les cellules FaDu par Ndoye et coll. (2004), la concentration de $TPPS_{2a}$ que nous utilisons s'avère trois fois supérieure (0,1 µg/mL pour 30 secondes d'exposition dans l'étude de Ndoye et coll.). Cette augmentation nécessaire de la concentration en photosensibilisant pourrait être liée à l'utilisation d'une PEI de nature différente de celle utilisée par Ndoye et coll. (2004) : la PEI utilisée dans notre étude est une molécule de 25kDa. Celle utilisée par Ndoye et coll. présente une masse moléculaire de 22kDa et est glucosée. Le franchissement des membranes cellulaires pour accéder au noyau est peut-

être plus aisé pour le second type de PEI. Néanmoins, la concentration de $TPPS_{2a}$ utilisée dans notre étude (0,3 µg/mL) demeure cohérente avec les études de PCI réalisées ces dernières années avec ce photosensibilisant (*Tableau 8*).

AUTEURS	PHOTOSENSIBILISANTS	TEMPS / PUISSANCE D'EXPOSITION A LA LUMIERE	VECTEUR PLASMIDE	MODELES CELLULAIRE	TOXICITE	TRANSFECTION
Prasmickaite, et coll. (2001) [87]	- $AlPcS_{2a}$ = 20µg/ml - TPPS2a = 2µg/ml - $TPPS_4$ = 75µg/ml - 3THPP = 0,25µg/ml - Photofrin = 2,5µg/ml - *p*-$TMPyPH_2$=30µg/ml	NR	- pE**GFP**-N1 - **Polylysine** (N/P=1,7) - **DOTAP**	THX : lignée cellulaire d'un mélanome malin	NR	Après PCI avec le complexe PLL/ADN : - $AlPcS_{2a}$ = 40% - TPPS2a = 30% - $TPPS_4$ = 10%l - 3THPP = 3% - Photofrin = 20% - *p*-$TMPyPH_2$ = 3%
Prasmickaite, et coll. (2002) [177]	- $AlPcS_{2a}$ = 20 µg/ml	- 3min	- pE**GFP**-N1 - **Polylysine**	THX : lignée cellulaire d'un mélanome malin	NR	Après illumination : - 30% de transfection
Ndoye, et coll. (2004) [168]	- $TPPS_{2a}$ = 0,1µg/ml	- 30 secs - 10 mW/cm^2	- pE**GFP**-C3 - **PEI** 22kDa tetraglucosé (Glu4) (N/P=5)	-FaDu : carcinome du pharynx - PANC3 carcinome du pancréas.	- PCI engendre 30 % de toxicité sur les cellules	Pour les cellules FaDu après 48h: - PEI 22kda= 22% - PEI 22kDa +PCI = 22% - PEI Glu4= 28% - PEI Glu4+ PCI= 44% Pour les cellules PANC 3 après 48h : - PEI 22kda= 17% - PEI 22kDa +PCI = 26% - PEI Glu4= 27% - PEI Glu4+ PCI= 36%
Maurice-Duelli, et coll. (2004) [175]	- $TPPS_{2a}$ = 0,1µg/ml	- 30 secs - 10 mW/cm^2	- pEGFP-C3 - pc4-PTEN - JetPEI® (N/P=5)	- Cellule Ishikawa= utérines	- JetPEI/GFP 30% de toxicité avec PCI - JetPEI/ PTEN/ GFP avec PCI = 80% de toxicité	- Quantification par RT-PCR - Témoin 1,72 - JetPEI/ADN = 3,34 - JetPEI/ADN + PCI= 7,22

AUTEURS	PHOTOSENSIBILISANTS	TEMPS / PUISSANCE D'EXPOSITION A LA LUMIERE	VECTEUR PLASMIDE	MODELES CELLULAIRE	TOXICITE	TRANSFECTION
Arnida et coll. (2006) [178]	- AlPcS2a incorporé dans la micelle	- 45 min - 3 mW/cm^2	- PEG-*b*-poly(ß-benzyl-L-aspartate) (**PEG-*b*-PBLA**): + **EDA** ethylenediamine + **DET** diethylenetriamine + **TET** triethylenetetramine + **TEP** tetraethylenepentamine	- HUH7 : cellule hépatome humaine	- Sans PCI = 20% de toxicité - Avec PCI= 40 à 60% de Toxicité	- Les meilleurs taux de transfection quelque soit le polymère sont à 5.10^{-4} mg/ml avec la PCI. - Sans PCI = 1.10^7 RLU/mg - PEG-*b*-P [Asp(EDA)]= 1.10^8 RLU/mg - PEG-*b*-P [Asp(DET)]= 1.10^9 RLU/mg - PEG-*b*-P [Asp(TET)]= 1.10^9 RLU/mg - PEG-*b*-P [Asp(TEP)]= 1.10^{10} RLU/mg
Nishiyama, et coll. (2006) [179]	- AlPcS2a incorporé dans la micelle	- 3 mW/cm^2	- pCAcc+Luc =**luciférase** - **PLL-PEG** micelles	- Hela: cancer du col de l'utérus - HuH-7 : hépatome humain	- DPc N/P= 1,2 > 40% de toxicité - N/P=2 > 20% de toxicité	- DPc N/P = 1,2 > 100 fold - DPc N/P = 2 > 10 – 30 fold
Kloeckner, et coll. (2006) [180]	- $TPPS_{2a}$ = 0,3µg/ml	- 60 secs - 13,5 mW/cm^2	- pCMV-Luc= **luciférase** - **PEI** (22kDa)/ADN (N/P 6)	- HUH7 : cellule hépatome humaine	NR	- Transfection en RLU/1000cells : - PEI22kDa/ADN - PCI= 10^5 - PEI22kDa/ADN - PCI= 10^7 - EGF/PEI 22kDa -PCI = 10^5 - EGF/PEI 22kDa +PCI = 10^7 - OEI-HD-1 - PCI = 10^4 - OEI-HD-1 + PCI = 10^6 - EGF/ OEI-HD-1 - PCI = 10^5
Shieh, et coll. (2008) [181]	-TAMCPP (5,10,15-tri(4-acetamidophenyl)-20-mono-(4-carboxy-phenyl)porphyrin)= 0,4 µM	- 200 sec ou 400 sec - 1,4 J/cm^2 ou 2,8 J/cm^2	- plasmide e**GFP** - **PAMAM-porphyrine**	- Hela: Cancer du col de l'utérus	Toxicité > 7% quelques soit la dose de luminosité	- Sans PCI > 3% - G4-TAMPCC sans PCI = 5% - G4-TAMPCC à 1,4 J/cm^2 = 12,6% - G4-TAMPCC à 2,8 J/cm^2 = 26,8% - Superfect®= 15%

Tableau 8 : Principales études de transfert de gènes associant la PCI aux vecteurs polymériques.

2.3.2 CYTOTOXICITÉ DES NANOPARTICULES ASSOCIÉES À LA PCI SUR LES CELLULES FADU.

Après avoir déterminé les conditions les plus favorables d'internalisation photochimique sur les cellules FaDu, nous avons étudié la cytotoxicité engendrée par les nanoparticules d'Eudragit® RS et RL associées à la technique de PCI. Les résultats du test MTT réalisé sur les cellules FaDu après 24h d'incubation sont décrits *Figure 21*. Il est à noter que la cytotoxicité des nanoparticules « seules » (sans internalisation photochimique) a été évaluée dans le chapitre 1 de l'étude expérimentale. Ces résultats sont rappelés ici afin de permettre une comparaison et de mieux visualiser l'impact de la PCI. Des points de contrôle de la transfection sans PCI ont été réalisés pour vérifier la reproductibilité des résultats sans PCI.

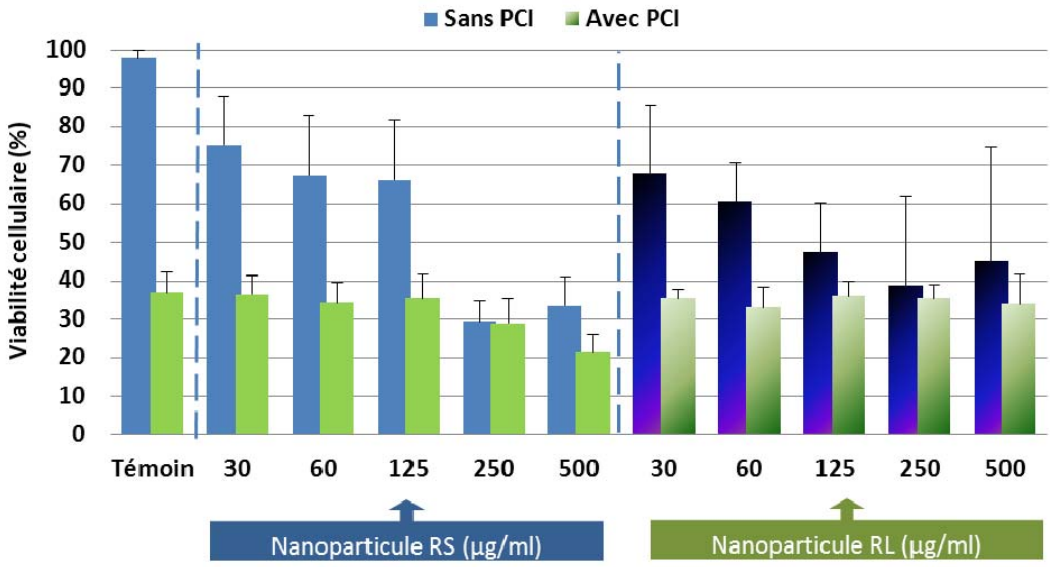


Figure 21 : Cytotoxicité en pourcentage de viabilité cellulaire, des nanoparticules d'Eudragit® RS et RL sur les cellules FaDu en association ou non à la méthode d'internalisation photochimique (moyenne ± écart-type ; n=9).

Le témoin « sans PCI » correspond aux cellules « seules » : sans particules ni PCI. Le témoin « avec PCI » correspond aux cellules mises en contact du $TPPS_{2a}$ pendant 18h et exposées à la lumière pendant 30 secondes. Le pourcentage de viabilité cellulaire est calculé en fonction de l'absorbance obtenue pour le témoin « sans PCI ». Ainsi, la PCI induit une toxicité de 60% sans

l'utilisation de nanoparticules. Pourtant, si plusieurs études ont montré une cytotoxicité liée à la technique de PCI [165, 167], les cellules FaDu montraient une relative résistance, comme l'ont décrites les études menées par Ndoye et coll. avec le photosensibilisant ($TPPS_{2a}$) : plus de 96% de cellules viables ont été retrouvées, quelle que soit la durée (entre 15 et 60 secondes) ou la concentration de $TPPS_{2a}$ (0,05 à 0,7 µg/ml).

En présence des nanoparticules d'Eudragit® RS et RL, le même niveau de cytotoxicité de 60% est retrouvé, quelque soit le type polymère utilisé ou la concentration de nanoparticules mise en contact avec les cellules. Dans nos essais et contre toute attente, la PCI entraîne donc une augmentation de la toxicité et, en association avec les nanoparticules, masque « l'effet dose » décrit dans le chapitre 1 de l'étude expérimentale.

Cependant dans la littérature, plusieurs études ont montré que la toxicité liée à la PCI entraînait une augmentation de la transfection. Par exemple, Hellum et coll. (2003) [182] ont montré que l'efficacité de transfection du plasmide pEGFP-ßAE-DMRIE/DOPE augmentait lorsque la toxicité liée à la PCI augmente, et en fonction de la durée d'exposition à la lumière. Les résultats obtenus ont montré que pour 60% de cytotoxicité, l'efficacité de transfection de la GFP atteint jusqu'à 80% sur la lignée HTC 116. C'est dans cette optique que nous avons donc poursuivi l'étude de transfection sur les cellules FaDu, malgré la cytotoxicité >60% obtenue.

2.3.3 TRANSFECTION DES CELLULES FADU À L'AIDE DES NANOPARTICULES ASSOCIÉES À LA PCI.

Le même vecteur d'ADN que celui décrit dans le chapitre 1 a été utilisé : il s'agit des nanoparticules d'Eudragit® RS et RL sur lesquelles le plasmide codant pour la green fluorescent protein (GFP) a été absorbé. Les résultats de cytométrie en flux obtenus précédemment ont été reportés sur la *Figure 22* pour permettre une comparaison et visualiser

l'effet de l'association nanoparticules - PCI. La lipofectamine est utilisée comme contrôle. Le taux de transfection de la lipofectamine sans PCI est d'environ 15% dans notre étude.

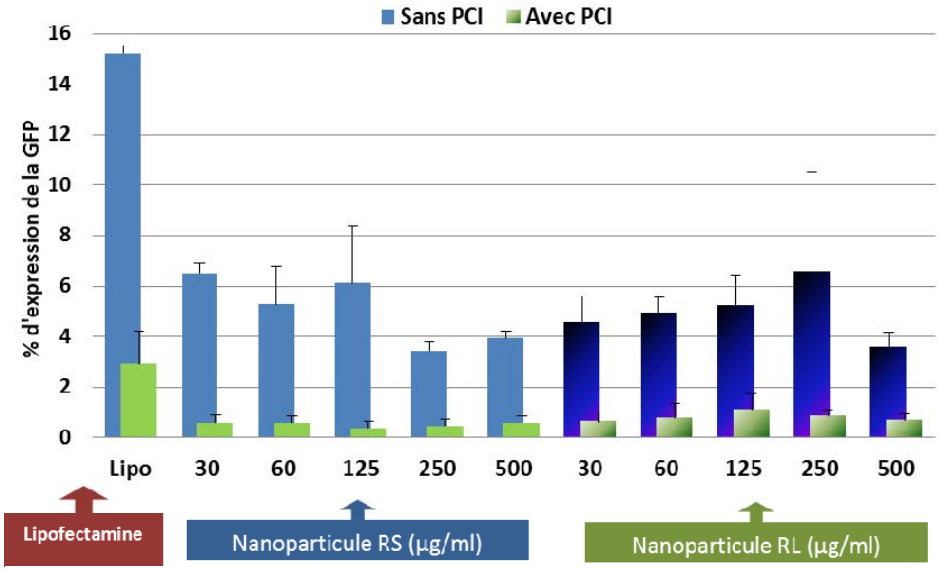


Figure 22 : Taux de transfection en fonction des nanoparticules d'Eudragit® RS et RL avec ou sans internalisation photochimique (moyenne ± écart-type ; n=4).

Le taux de transfection obtenu sans PCI est d'environ 6% quelque soit le polymère ou la concentration utilisés. Pour les concentrations de 250µg/ml à 500µg/ml, le taux de transfection diminue légèrement, sans pour autant montrer une différence significative. En revanche, la technique d'internalisation photochimique diminue le taux de transfection à 2% environ.

Contrairement à ce que Hellum et coll. (2003) avaient constaté sur les cellules HTC116, nos résultats avec la PCI montrent une inhibition totale du transfert de gène [182]. Plusieurs points peuvent expliquer ces résultats négatifs de transfection :

- L'efficacité de la PCI est totalement dépendante de la combinaison entre principalement l'agent photosensibilisant/ le type cellulaire/ la molécule ou le vecteur à internaliser / la puissance et la durée d'exposition à la lumière. Il s'agit donc à chaque nouvel essai de combiner ces facteurs et de trouver le meilleur équilibre. Le protocole que nous avions optimisé sur les

cellules FaDu avec les complexes PEI/ADN (exposé dans ce chapitre 2) n'est pas adapté aux vecteurs polymériques, en regard des résultats très faibles de transfection obtenus. Le relargage des complexes de l'endosome vers le cytoplasme, est influencé par la taille des complexes [167]. Nous avons présenté à notre connaissance, la première étude associant un vecteur polymérique à la PCI. Un réajustement des différents paramètres de la PCI est sans doute nécessaire en effectuant, par exemple, un test systématique de différents agents photosensibilisants. Les quelques études effectuées sur des vecteurs proches de liposomes [176] peuvent difficilement nous informer quant aux paramètres de PCI à utiliser, étant donnée la nature du vecteur : les lipides et bicouches lipidiques interagissent facilement avec les membranes cellulaires, cible majeure de la PCI. Les polymères et vecteurs polymériques ne peuvent pas établir les mêmes contacts avec les membranes.

- La PCI entraîne une mort cellulaire de par les dommages causés par l'exposition à la lumière, par l'activation du photosensibilisant intercalé dans les membranes qui aboutit à une déstabilisation des bicouches lipidiques. Cette cytotoxicité s'ajoute à la fragilité cellulaire engendrée par les vecteurs polymériques. Le nombre de cellules dans le puits se trouve réduit, la machinerie cellulaire est mobilisée pour tenter de réparer les dommages et ne peut plus intervenir pour permettre la transfection.

- La PCI endommage la membrane de l'endosome, mais peut également dégrader la molécule internalisée. L'ADN peut être endommagé par l'induction d'une oxydation, conduisant à la fois à l'induction de mutations mais également à la perte de l'expression de la protéine qu'il code [165]. Dans le cas des nanoparticules d'Eudragit que nous avons formulées, l'ADN est adsorbé en surface ce qui le rend plus sensible à ce type de phénomène.

2.4 CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons évalué l'impact de la PCI sur le transfert de gènes par des nanoparticules polycationiques d'Eudragit® RS et RL sur les cellules FaDu. Ces travaux constituent, à notre connaissance, la première étude décrivant l'association de vecteurs polymériques avec la PCI pour augmenter l'efficacité de transfection d'ADN, mais malgré une adaptation de la méthode de PCI sur les cellules FaDu, les résultats obtenus ne répondent pas à nos attentes. Une cytotoxicité trop importante est à notre avis l'explication majeure à ces faibles taux, causée par la technique de PCI mais aussi par le vecteur utilisé dont les caractéristiques physico-chimiques (taille, charge…) fragilisent la cellule. Une optimisation du vecteur nous paraît être l'orientation à envisager à la vue de ces résultats.

Article 2

Evaluation of poly (D,L-lactide-co-glycolide) and polyethylenimine nanoparticles coupled with photochemical internalization for pDNA transfection.

Soumis à International Journal of Pharmaceutics

3 ARTICLE 2 : EVALUATION DU TRANSFERT DE GÈNES DE NANOPARTICULES DE PLGA ET PEI COUPLÉE À LA MÉTHODE D'INTERNALISATION PHOTOCHIMIQUE.

Dans le but d'avoir un outil efficace et transposable au « chevet du patient », des nouveaux vecteurs nanoparticulaires constitués d'une combinaison de polymères biocompatibles ont été développés. Deux polymères ont été utilisés pour la préparation des nanoparticules : un copolymère d'acide lactique et glycolique (PLGA), et la polyéthylenimine (PEI) qui est un polymère fortement cationique. Dans le but de diminuer la cytotoxicité et d'améliorer la demi-vie du complexe PEI/ADN, des nanoparticules de PLGA/PEI ou PLGA ont été réalisée pour le transfert de l'ADN (sous forme d'un plasmide codant pour la GFP). Les nanoparticules ont été formulées par la méthode de double émulsion et deux systèmes nanoparticulaires ont été préparées avec l'ADN: des nanoparticules PLGA/PEI sur lesquelles l'ADN a été adsorbé (PLGA/PEI-ADN), ainsi que des nanoparticules de PLGA sur lesquelles le complexe PEI/ADN a été adsorbé (PLGA-PEI/ADN). Les nanoparticules ont été ensuite caractérisées d'un point de vue physico-chimique (potentiel zêta, adsorption d'ADN ou du complexe PEI/ADN, toxicité et transfert de gènes). Dans cette étude, les rapports PLGA-PEI/ADN (1,3mg/ml de nanoparticules de PLGA), et PLGA/PEI-ADN (N/P=20) ont été évalués à l'aide d'un dosage du bromure d'éthidium (un agent intercalant de l'ADN) ou par chromatographie sur gel d'agarose.

Disposant ainsi d'un nouveau vecteur potentiel pour la transfection, les tests de cytotoxicité et de transfection ont été réalisés sur la lignée cellulaire FaDu. Les résultats de cytotoxicité ont montré une forte toxicité du complexe PEI/ADN au rapport N/P=20 (environ 40% de toxicité). Par contre, les nanoparticules de PLGA-PEI/ADN et PLGA/PEI-ADN ont montré une moindre toxicité (20 à 60% de mortalité selon la concentration) par rapport au complexe seul. Les

résultats de transfection sur les cellules FaDu sont très variables selon le type de nanoparticules utilisées (de 2 à 80% de transfection).

La méthode d'internalisation photochimique (PCI) à été associée au transfert de gènes par les nanoparticules polymériques et les effets de cette association ont été observés. Néanmoins, la PCI n'améliore que légèrement les taux de transfection. Une différence significative n'est observée que pour deux concentrations de nanoparticules de PLGA-PEI/ADN.

Photochemical internalization for pDNA transfection: Evaluation of poly (D,L-lactide-co-glycolide) and poly(ethylenimine) nanoparticles

M. Gargouri [a], A. Sapin [a], B. Arıca-Yegin[a,b], JL. Merlin [c], P. Becuwe [d], P. Maincent [a*]

[a] Nancy University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, EA 3452, Nancy, France.

[b] Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 06100, Sihhiye-Ankara, Turkey.

[c] Centre Alexis Vautrin, Tumor Biology Unit, EA SiGreTo, Vandœuvre lès Nancy, France.

[d] Nancy University, Faculty of Science, EA SiGreTo, Vandœuvre lès Nancy, France

Key words: Gene delivery, nanoparticles, photochemical internalization, poly (D,L-lactide-co-glycolide), polyethylenimine.

*Corresponding author: Professor Maincent Philippe

Address: Nancy University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, 5 rue A. Lebrun, BP 80403, F-54001 Nancy, France.

Tel: + 33 3 83 68 22 96; Fax + 33 3 83 68 23 01

Email: philippe.maincent@pharma.uhp-nancy.fr

Abstract

The main objective of this study was to prepare two types of nanoparticles with poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) and polyethylenimine (PEI) polymers. Plasmid DNA (pDNA) was adsorbed either on PLGA/PEI nanoparticles, or as PEI/DNA complex onto the surface of PLGA nanoparticles. Both types of nanoparticles were prepared by the double emulsion method. The nanoparticles were characterized by their size, zeta potential and pDNA or PEI/DNA complex adsorption. The PEI/DNA complex adsorption was confirmed with ethidium bromide assay. pDNA adsorption onto PLGA/PEI nanoparticles (PLGA/PEI-DNA) was studied by electrophoresis on agarose gel. Cytotoxicity and transfection efficiency of both types of nanoparticle formulations were studied in head and neck squamous carcinoma cell line (FaDu). To improve endosomal release, photochemical internalization (PCI) was used. The zeta potential increased when the PEI/DNA complex adsorbed onto PLGA nanoparticles (PLGA-PEI/DNA). Optimal pDNA adsorption efficiency was achieved for nitrogen/phosphorous ratio ≥ 20/1. In vitro transfection and cells viability on FaDu cells with or without PCI were found to be variable depending on the type and concentration of nanoparticles. The results showed that transfection efficiency for PLGA/PEI-DNA or PLGA-PEI/DNA nanoparticles ranged between 2 and 80%, respectively. PCI was found to slightly improve the transfection efficiency for all formulations.

1. Introduction

Gene therapy is a promising technology for the treatment of genetic diseases. Most studies used viral vectors due to their high transfection efficiency (Liu et al., 2010; Wang et al., 2010; Wolfe et al., 2010). However toxicity, immunogenicity, including mutagenesis issues may limit the use of viral vectors. Recently, the use of non-viral vectors such as cationic polymers (O'Rorke et al., 2010), liposomes (Oliveira et al., 2009; Xiao et al., 2010) and nanoparticles (Fay et al., 2010; Yang et al., 2010) to deliver plasmid DNA (pDNA) has been developed as an alternative strategy with less immunogenicity. In addition non-viral vectors are much easier to produce in large quantities (Niven et al., 1997). Among non-viral vectors, nanoparticles have been developed for their multiple advantages in drug delivery. When coating or ligand materials are attached at the surface of biodegradable nanoparticles, higher stability, and easier uptake into cells by endocytosis, and targeting ability to specific tissues or organs, has been reported.

One of the most popular biodegradable polymer is poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA). PLGA has been approved by the Food Drug Administration for transfection trials in humans (Budker et al., 1996; Sahoo et al., 2002). Previous studies have demonstrated the potential of PLGA nanoparticles to deliver genes into cells (Fay et al., 2010; Niu et al., 2009; Son and Kim, 2010). Following cells endocytosis, PLGA nanoparticles escape rapidly from the degradative endo-lysosomal compartment to the cytoplasmic compartment (Panyam et al., 2002). The degradation time of PLGA can be altered from several days to years by varying the polymer molecular weight, the lactic acid to glycolic acid ratio in copolymer, or the nanoparticles structure. pDNA could be encapsulated (Cohen et al., 2000) or adsorbed onto nanoparticles (Kumar et al., 2004; Rhaese et al., 2003).

In order to achieve an efficient transfection, the addition of a cationic polymer, e.g. polyethylenimine (PEI) which is commonly used for non-viral pDNA delivery systems, to the

PLGA nanoparticles was already investigated (Bivas-Benita et al., 2004; Katas et al., 2009; Park et al., 2008). Adsorption is based on the ionic interactions between the cationic polymers and the anionic pDNA (Singh et al., 2000). PEIs are polymers available in two forms i.e. linear and branched. Compared to linear forms, branched PEI has shown a better cells rate transfection (Godbey et al., 1999). PEIs exhibit a high positive charge density when protonated in aqueous solutions. The high positive charge density of PEI causes an electrostatic interaction with anionic charged species such as pDNA to form polyplexes. Furthermore, PEI protected pDNA from the degradation of nuclease activity (Kim et al., 2007).

Photochemical internalization (PCI) is a promising technology for site-specific release of macromolecules within cells. The mechanism of PCI is based on the breakdown of the endosomal/lysosomal membranes by photoactivation of photosensitizers that localize in the membranes of the endosomes (Berg et al., 1999) as shown in Fig. 1. This technology has been used to release several macromolecules such as bleomycin (Berg et al., 2005), gelonin (Dietze et al., 2003), DNA as a complex with cationic polymers (Ndoye et al., 2004b) or incorporated in adenovirus (Bonsted et al., 2004) and nucleic acid (Folini et al., 2003), from endocytic vesicles to the cytosol. PCI can significantly increase the transfection efficiency of PEI/DNA complex *in vitro* (Ndoye et al., 2004a), and *in vivo* (Ndoye et al., 2006).

In this study, two types of nanoparticles were evaluated to deliver pDNA into human head and neck squamous carcinoma cell line (FaDu). An optimisation of photochemical internalization conditions was made in a previous study onto this cell line (Ndoye et al., 2004b). PLGA nanoparticles incorporating PEI were prepared using a double emulsion method and the resulting nanoparticles were used to adsorb pDNA for the cell transfection study. In addition, unloaded PLGA nanoparticles were prepared, and PEI/DNA complexes were adsorbed onto their surface. Both type of nanoparticles were characterized with regards to their size, zeta

potential, adsorption as well as evaluation of transfection efficiency and cytotoxicity into FaDu cells. Furthermore, the effects of PCI on pDNA transfer in human cancer cells were evaluated using PLGA/PEI or PLGA nanoparticles.

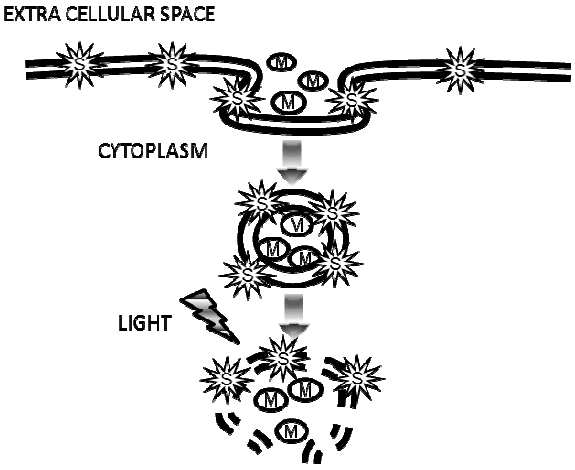


Figure 1: *Photochemical internalisation mechanism: a photosensitiser (S) and the macromolecule of interest (M) are endocytosed and co-localised to endocytic compartments. Light exposure of the cells introduces rupture of the membrane of these vesicles and subsequent cytosolic release of macromolecules.*

2. Materials and Methods

2.1. Materials

pEGFP-C3 plasmid DNA coding for Green Fluorescent Protein (GFP) was obtained from Clontech (Montigny le Bretonneux, France). The following polymers were used as received: poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA 50:50; Resomer RG® 503H, viscosity 0.42 dl/g, uncapped; Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany) and polyethylenimine (PEI 25 kDa, branched; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The poly(vinyl alcohol) (PVA, M_w 30,000, 99% hydrolyzed) was obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The human head and neck squamous carcinoma cell line (FaDu) was kindly provided by Professor A. Hanauske (Munich University, Germany) (ATCC number HTB-43™). Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) cell culture medium and Lipofectamine™ 2000 (transfection

reagent, a cationic lipid), were purchased from Invitrogen Life Technology (Cergy-Pontoise, France). Disulfonated meso-tetraphenylporphine ($TPPS_{2a}$) (LumiTrans®) was used as photosensitizer and was kindly provided by PCI Biotech (Oslo, Norway). Lumisource® was used as light source.

2.2. Preparation of PLGA/PEI and PLGA nanoparticles

The preparation method of PLGA/PEI or PLGA nanoparticles was a modification of the double emulsion method described by Park et al, 2008. Briefly, 4 mL of an organic phase containing PLGA (50 mg/mL in methylene chloride) were magnetically stirred during 15 seconds with 1 mL of an aqueous solution of PEI (5 mg/mL) or plain water (1 mL). This emulsion was poured into 16 mL of PVA aqueous solution (5% w/v), and sonicated (80W for 30 s) using an ultrasonic homogenizer (Vibracell 75022, Bioblock, Illkirch, France). The solvent was then evaporated under vacuum using a rotary evaporator at 40 °C for 1 minute (Heidolph 94200, Bioblock, Illkirch, France). The resulting nanoparticles were obtained by centrifugation (42,000 g, 20 min, 20 °C). The pellet was washed three times with purified water and was re-suspended in 2 mL of purified water. The obtained nanoparticles suspensions were stored at 4°C.

2.3. pDNA preparation

pDNA, pEGFP-C3 encoding the green fluorescent protein (GFP) was propagated into *E.Coli* bacterial strain. Transformed cells were grown in Lysogeny Broth (LB) medium (Tryptone, yeast extract and NaCl). Plasmid was purified using Marligen maxiprep™ high purity plasmid purification columns (Clinisciences, Montrouge, France). The pDNA concentration was determined by UV spectrophotometry (Uvikon 922, Kontron, Eching, Germany) at 260 nm and

the purity was confirmed by using 0.8% agarose gel electrophoresis (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) in the presence of ethidium bromide (EtBr).

2.4. PEI/DNA complexes preparation and adsorption of pDNA or PEI/DNA complexes onto nanoparticle surface

PEI/DNA complexes were prepared according to various nitrogen/phosphorous (N/P) ratios. The PEI polymer concentrations were calculated from the desired N/P ratio and the amount of plasmid assuming that 43.1 g/mol^{-1} corresponds to each repeating unit of PEI containing one nitrogen atom, and 330 g/mol^{-1} corresponds to each repeating unit of pDNA containing one phosphorous atom. The resulting charge ratio is expressed as PEI nitrogen/ DNA phosphorous (Ho et al., 2008).

Different N/P ratios (from 5 to 20; PEI or PLGA/PEI nanoparticles) were adsorbed with a fixed amount of pDNA. Briefly, 4 µg of DNA in 5% glucose solution were mixed with different amounts of PEI or PLGA/PEI nanoparticles (according to the tested N/P ratio) also diluted in 5% glucose solution. PEI solution or PLGA/PEI nanoparticles suspension (50 µL) was added to the pDNA solution (50 µL), mixed by vortexing for 10 s and incubated for 30 min at room temperature. Attention has to be taken to the nomenclature used in this manuscript: Blank PLGA nanoparticles adsorbed with the PEI/DNA complexes are called PLGA-PEI/DNA nanoparticles whereas PLGA/PEI nanoparticles adsorbing the naked pDNA are called PLGA/PEI-DNA nanoparticles. For PLGA-PEI/DNA nanoparticles, the PEI/DNA complexes (N/P = 20), prepared in advance as mentioned above, were added to different concentrations of blank PLGA nanoparticles suspensions (from 1.3 to 29.8 mg/mL) and were incubated for one hour at room temperature.

The adsorption efficiency of pDNA (alone or complexed with PEI) adsorbed onto PLGA nanoparticles was obtained by measuring the extinction fluorescence with ethidium bromide

(EtBr). After adsorption, nanoparticles were centrifuged at 42,000 g and 100 µL of supernatant was collected. Tris-HCl (80 µL) and 20 µL of EtBr (100 µg/mL) were added into each well of a black plate. Fluorescence studies were performed using a fluorescence spectrometer Synergy 2 (Biotek Instruments GmbH, Colmar, France) at an excitation wavenlength of 524 nm and emission wavelength of 582 nm.

2.5. Particle size and zeta potential

The size of the nanoparticles and zeta potential were measured with a Zetasizer 3000E (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). All the analyses were conducted in triplicate and the results are expressed as means of the three measurements.

2.6. Agarose gel electrophoresis of pDNA

The amount of pDNA bound onto PLGA/PEI nanoparticles or complexed with PEI was determined by the electric mobility of pDNA into a 0.8% agarose gel. Different N/P ratios (1/1; 3/1; 5/1; 20/1; 40/1; 50/1 ratios between PLGA/PEI nanoparticles and pDNA) were tested with a fixed amount of pDNA (4 µg). Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 90V (Bio-Rad®, Marnes-la-coquette, France) for 30 min in TBE buffer (4.45 mM Tris-base, 1 mM sodium EDTA, 4.45 mM boric acid, pH 8.3) containing 0.5 µg/mL EtBr. The gels were visualised under a UV transluminator (Geldoc 2000, Bio-Rad®, Marnes-la-Coquette, France).

2.7. *In vitro* release

Release study of either PEI/DNA complexes or pDNA adsorbed onto nanoparticles was determined. Both types of nanoparticles suspension (200 µL) were incubated in 200 µL of Tris-HCl buffer (pH 7.4), in a shaking incubator at 37°C. Nanoparticles were centrifuged for 20 min at 42,000g and supernatants were taken periodically. Then, nanoparticles were resuspended

and reincubated in fresh Tris-HCl buffer (pH 7.4) (400 µL) till the next sampling time. Supernatants were analysed using EtBr assay as previously described in chapter 2.4.

2.8. *In vitro* photochemical transfection

10^5 cells per well, were seeded in 24-well culture plates at 37°C in a 5% CO_2 in humidified atmosphere for 24 h to reach 70% confluence at the time of transfection. Then, for the photochemical transfection study the cells were incubated for 18 h with 0.3 µg/mL of $TPPS_{2a}$ and kept in the dark until the end of the protocol. LumiTrans® was dissolved in dimethylsulfoxide (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) as a 350 µg/mL stock solution.

Subsequently, cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and supplemented with 0.5 mL of fresh serum-free RPMI medium. The formulations and Lipofectamine™ 2000 were added to the cells and homogenized. FaDu cells were incubated at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere for 2 hours. Cells were submitted 30 seconds to blue light emitted by Lumisource® and fresh medium composed of 20% FBS (500 µL) was added. Lumisource® is a bank of 4 fluorescent tubes designed to provide homogeneous illumination of the treatment area, emitting mainly blue light with a peak at 420 nm. The light emission from the illumination area was measured and showed a high homogeneity with a fluence rate of 10 ± 0.1 mW/cm^2 over the light field. After 24 h, the cells were washed with PBS and incubated with 200 µL of trypsin/EDTA (0.05%) for 5 min at 37°C. The cells were obtained in 2 mL of complete fresh medium and centrifuged at 430 g for 10 min at 20°C. In a final step, pellets were dispersed in PBS and cells were analysed for GFP expression using flow cytometery (FACS Calibur, BD FACS Calibur™, Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France) (488 nm excitation, 510-520 nm band-pass filter emission). Fluorescence parameters from 10^4 cells were acquired

and analyzed using Cell Quest® software program (Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France).

2.9. Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of both types of nanoparticles (PLGA-PEI/DNA or PLGA/PEI-DNA), the PEI/DNA complexes and the Lipofectamine™ 2000 was evaluated using the (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) MTT colorimetric test. The test is based on the ability of living cells to reduce the water-soluble yellow dye, MTT, to purple water-insoluble formazan product by mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase. FaDu cells, seeded in 24-well culture plates (10^5 cells/well), were washed twice with PBS at 37°C. For the photochemical cytotoxicity study, $TPPS_{2a}$ photosensitizer was added (0.3 µg/mL) 18 h before adding the nanoparticles suspensions. Increasing concentrations of nanoparticles or PEI/DNA complexes were added to the cells in FBS free medium and homogenized. FaDu cells were further incubated at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere for 2 hours. PCI was performed and cells were reincubated for 2 hours. Then, 500 µL of 20% FBS complete medium were added in each well for 24 hours. Thereafter, cell viability was determined by the MTT assay according to the procedure described by (Ndoye et al., 2004a). Briefly, 250 µL of MTT solution (2.5 mg/mL in PBS) were added in each well and plates were incubated at 37°C for 4h. The formed formazan crystals were dissolved using a 25% aqueous solution of sodium dodecyl sulfate (250 µL/per well). The absorbance was measured at 570 nm using a multiwell-scanning spectrophotometer EL 800 universal microplate reader (Biotek Instruments GmbH, Colmar, France). Cell viability was determined as a percentage of absorbance relative to untreated cell.

2.10. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using a Mann-Whitney U test. Data are presented as means ± standard deviation (SD). $p < 0.05$ was considered as statistically different.

3. Results

3.1. Particle size and zeta potential of nanoparticles

Blank PLGA nanoparticles diameter was around 380 nm (± 10 nm). When prepared with PEI the PLGA/PEI nanoparticles size decreased slightly 322 nm (± 14 nm) as the amount of PEI increased. Zeta potential of PLGA/PEI nanoparticles was determined according to the quantity of PEI added at the beginning of preparation. As shown in Fig. 2 a, all zeta potentials of PLGA/PEI nanoparticles were positive, ranging from +40 (± 2 mV) to +42 (± 3 mV) for 5 mg/mL and 200 mg/mL of PEI, respectively whereas negative values were observed for blank PLGA nanoparticles (- 26 ± 2 mV). For the following studies, we decided to formulate nanoparticles with a PEI concentration of 5 mg/mL.

Adsorption of PEI/DNA complexes onto PLGA nanoparticles was evaluated by zeta potential measurements. As shown in Fig. 2 b, zeta potential increased in presence of PEI/DNA complexes (N/P = 20). Zeta potential of blank PLGA nanoparticles was around -25 (± 5 mV); after PEI/DNA complexes adsorption and increased to +40 (± 3 mV) for 29.8 mg/mL nanoparticle concentration. At the concentration of 1.3 mg/mL of PLGA nanoparticles (lowest nanoparticles concentration), zeta potential was +25 (± 7 mV). For 10.9 mg/mL nanoparticles concentration, the zeta potential was already + 40 (± 3 mV) meaning that a plateau was obtained. This result was confirmed with the following ethidium bromide assay.

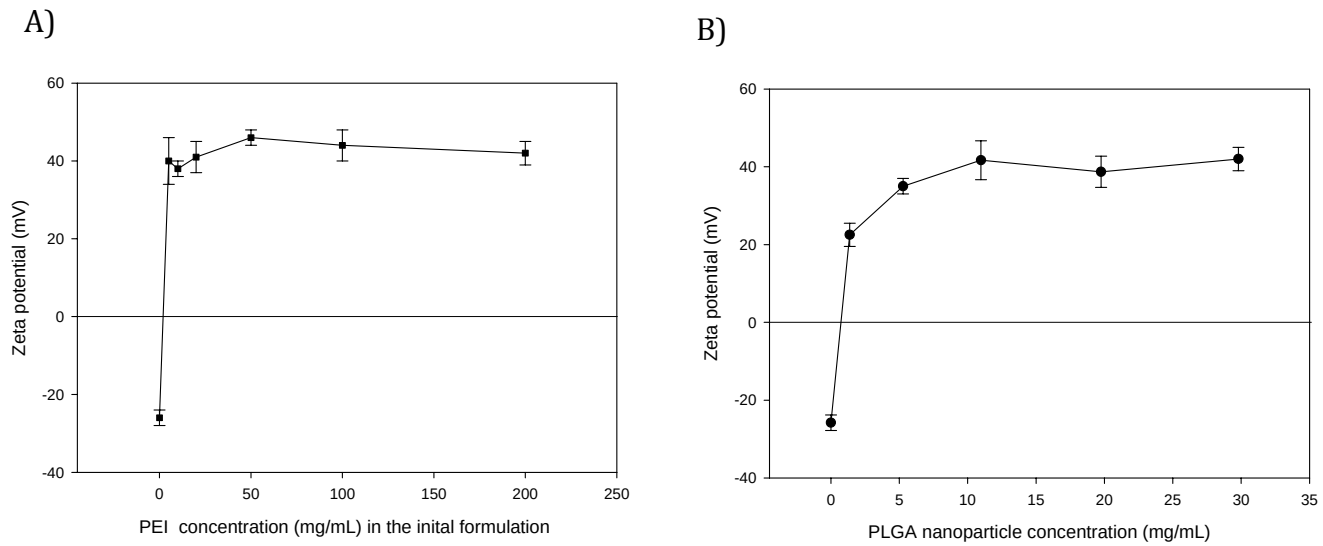


Figure 2: (a) *Influence of increasing PEI concentrations on zeta potential of PLGA/PEI nanoparticles (n=3 ± SD).* ***(b)*** *PLGA nanoparticles binding efficiency and adsorption capacity to adsorb PEI/DNA N/P=20 complex. PEI/DNA complex (N/P=20) were prepared, then incubated with PLGA nanoparticles and zeta potential was measured (n=3 ± SD).*

3.2. Ethidium bromide assay

Analysis of PEI/DNA complex (N/P = 20) efficiency adsorbed onto PLGA nanoparticles was performed with ethidium bromide exclusion assay (Fig. 3). PEI/DNA complexes were adsorbed onto the nanoparticles for different concentrations of PLGA nanoparticles, ranging from 1.3 mg/mL to 29.8 mg/mL. The results showed a significant decrease in percentage of relative fluorescence for all PLGA nanoparticle concentration ($p< 0.05$). It showed that PEI/DNA complexes were efficiently adsorbed onto PLGA nanoparticles starting at 1.3 mg/mL of nanoparticle concentration. These results were consistent with those advanced in measuring the zeta potential.

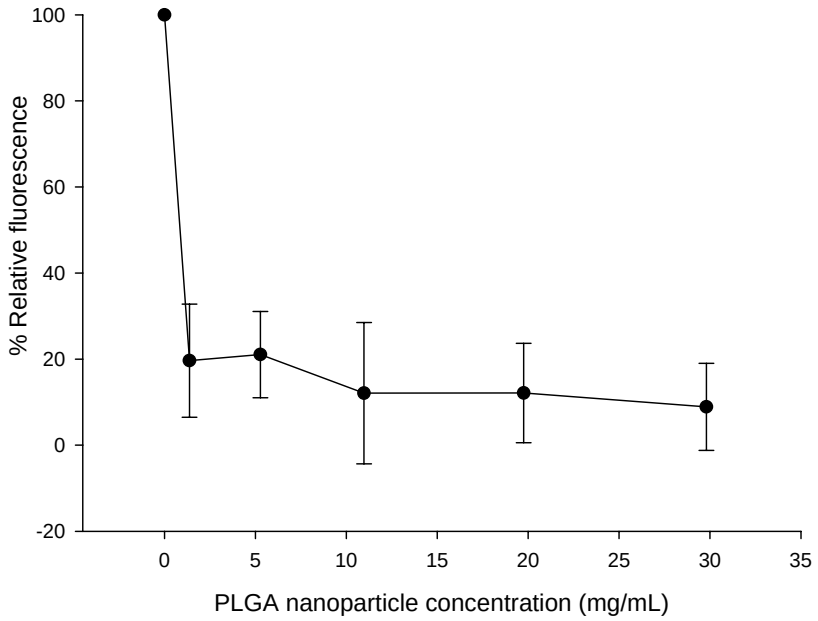


Figure 3: *Characterisation of the binding interaction between PLGA nanoparticles and PEI/DNA (N/P = 20) complex. Free PEI/DNA complexes were incubated with ethidium bromide (100% fluorescence), then incubated with PLGA. Data present the means of triplicate samples ± SD.*

3.3. Agarose gel electrophoresis of pDNA

The agarose gel electrophoresis was carried out to confirm whether the pDNA was associated to the PLGA/PEI nanoparticles (Fig. 4). PLGA/PEI nanoparticles, with or without pDNA, are too large to diffuse through the agarose matrix. Therefore, only pDNA which is not bound onto the surface of nanoparticles is able to migrate to the positive electrode in the same manner as the naked pDNA (Elfinger et al., 2009). Thus, different concentrations of PLGA/PEI nanoparticles were incubated with a constant amount of pDNA in order to determine the optimal N/P ratio. Optimal pDNA adsorption efficiency was achieved for N/P ratios ≥ 20/1. Contrary, for N/P 1/1, 3/1 and 5/1 ratios, pDNA was not totally bound onto nanoparticles.

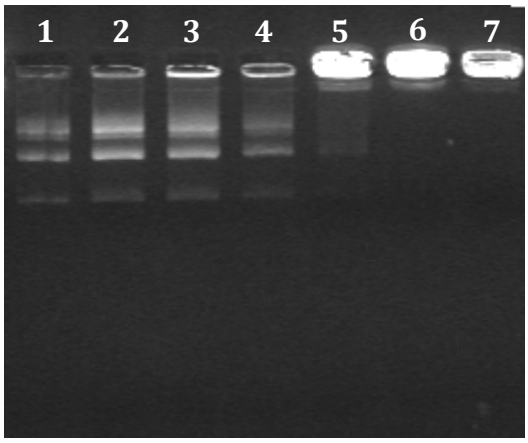


Figure 4: *Agarose gel of DNA (4 µg) adsorbed onto different amount of PLGA/PEI nanoparticles with different N/P ratios (NP PLGA/PEI-DNA). The samples from the left to the right were as follows, (lane 1) Naked DNA; (lane 2), ratio N/P=1/1, (lane 3) ratio N/P=3/1, (lane 4) ratio N/P=5/1, (lane 5) ratio N/P=20/1, (lane 6) ratio N/P=40/1, (lane 7) ratio N/P=50/1.*

3.4. *In vitro* release

An initial increase in release was observed for each type of nanoparticles either with pDNA or PEI/DNA complexes (Fig. 5). The initial release was higher with the nanoparticles adsorbing the PEI/DNA complexes. The initial and overall release for the PLGA-PEI/DNA nanoparticles concentration of 10.9 mg/mL was found to be statistically higher than that observed for the 1.3 and 29.8 mg/mL concentration ($p< 0.05$). The release of PEI/DNA was between 30% and 80% after 24 h for the 29.8 and 10.9 mg/mL nanoparticles concentration, respectively. As for the PLGA/PEI-DNA nanoparticles, the release of pDNA reached almost 25% after 24 h for all N/P ratios. The incorporation of PEI into the PLGA nanoparticles significantly influenced the release rate of pDNA when compared with the nanoparticles adsorption of the PEI/DNA complex ($p< 0.05$).

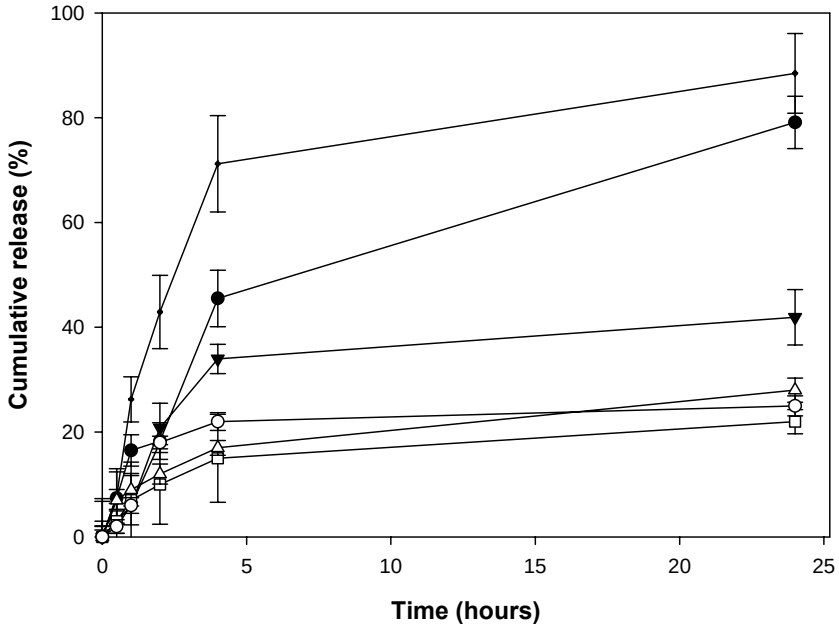


Figure 5: *Cumulative release of pDNA and PEI/DNA complex from PLGA/PEI-DNA and PLGA-PEI/DNA nanoparticles into PBS at 37°C. Data are shown as mean ± SD (n=3).* *PLGA-PEI/DNA 1.3mg/ml;* *PLGA-PEI/DNA 10.9 mg/ml;* *PLGA-PEI/DNA 29.8 mg/ml;* *PLGA/PEI-DNA (N/P=5);* *PLGA/PEI-DNA (N/P=10);* *PLGA/PEI-DNA (N/P=20).*

3.5. *In vitro* photochemical transfection and cytotoxicity assay

Gene transfection efficiency was compared between PEI/DNA complexes (N/P ratio from 5 to 20), PLGA/PEI-DNA nanoparticles, and PLGA-PEI/DNA nanoparticles (Fig. 6 a-d). In the case of PEI/DNA complexes (Fig.6 b), it was observed that the GFP expression increased when the N/P ratio was increased. However, the differences were not statistically different between the lowest (5) and the highest (20) N/P ratios ($p > 0.05$). Binding the PEI/DNA complexes (only for N/P ratio of 20) onto PLGA nanoparticles, did significantly improve the transfection efficiency ($p < 0.05$, Fig. 6 c). On the contrary, the transfection efficiency was decreased for 10.9 and 29.8 mg/mL of nanoparticle concentrations whereas it was similar for 1.3 mg/mL of the concentration. Surprisingly, in the case of pDNA adsorbed onto the PLGA/PEI nanoparticles (Fig.6 d), there was very low transfection efficiency (> 3%). When compared with a well-

known commercial standard (i.e. Lipofectamine™ 2000), it was observed that the PEI/DNA complexes either alone or bound onto the PLGA nanoparticles (for the 1.3 and 10.9 mg/mL concentration) improved dramatically the transfection efficiency (> 60%).

PCI improved the transfection efficiency in PEI/DNA complexes and PLGA-PEI/DNA nanoparticles. However a statistical enhancement of about 2 fold in GFP expression was noticed for the N/P ratio of 5 for the PEI/DNA complexes (Fig. 6 b). In the case of the PEI/DNA complexes bound onto PLGA nanoparticles (Fig. 6 c), a significant increase was also observed for the 1.3 and 10.9 mg/mL nanoparticle concentrations ($p< 0.05$).

The cytotoxicity of PEI/DNA complexes, PLGA-PEI/DNA and PLGA/PEI-DNA nanoparticles, and Lipofectamine™ 2000 was investigated in FaDu cell line, with or without PCI (Figure 7 a-d). The results revealed that all systems, with or without PCI, were toxic to some extent when compared to untreated cells. Using Lipofectamine™ 2000, approximately 20% loss of cell viability was found, and no significant increase was observed when PCI was used ($p> 0.05$, Fig. 7 a). In the case of the PEI/DNA complexes (Fig. 7 b), the higher the N/P ratio, the more toxic the system was. When the complex was bound onto the PLGA nanoparticles, toxicity was found to decrease with increasing concentration of nanoparticles (Fig. 7 c). PLGA/PEI nanoparticles adsorbing pDNA, toxicity was also observed from 30% to approximately 20% for N/P= 5 and the N/P= 20 ratio, respectively. A slight decrease in toxicity was observed when N/P ratio was increased (Fig. 7 d). When PCI was used, cells viability decreased approximately between 10 to 20 % for both types of nanoparticles and PEI/DNA complexes.

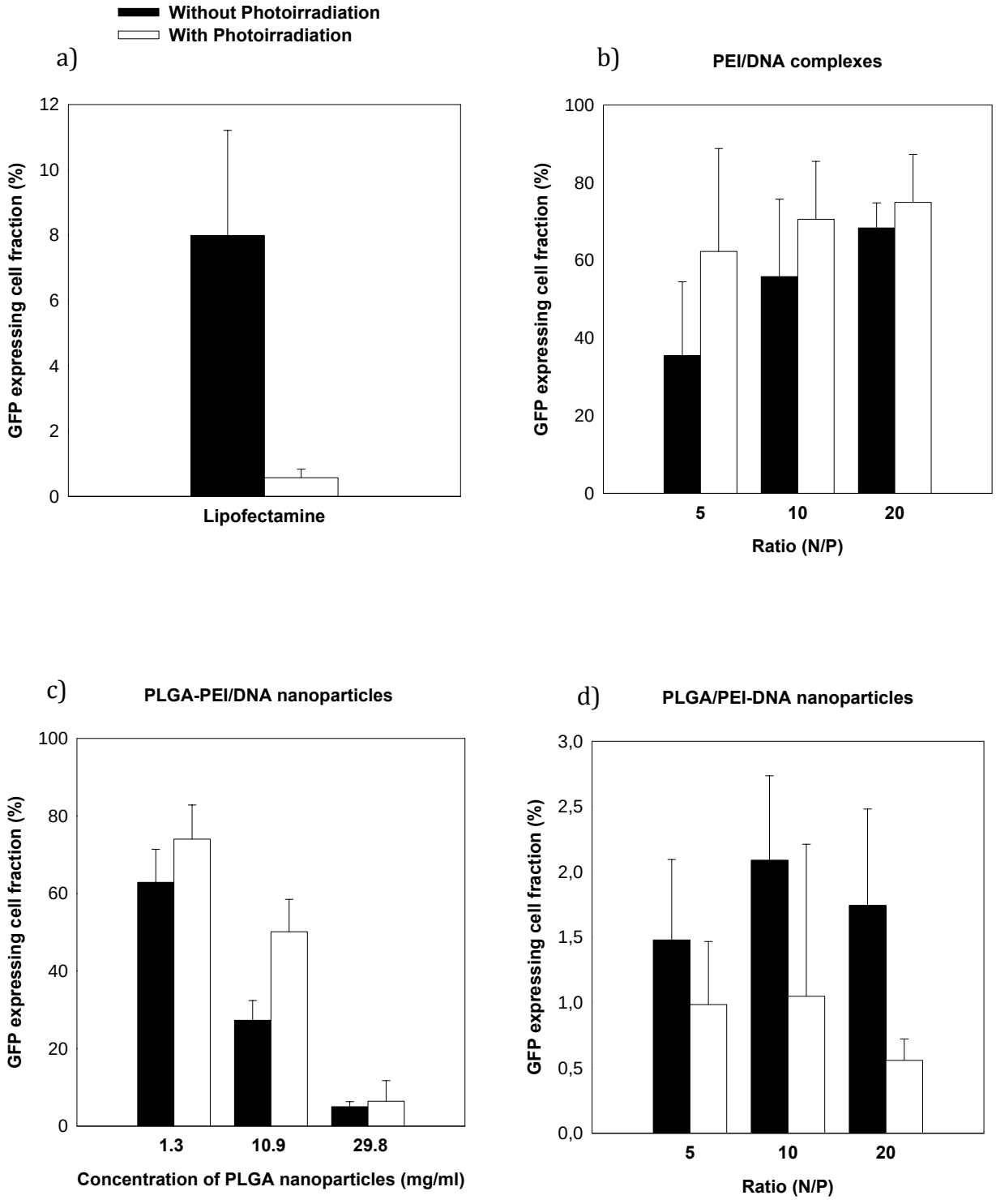


Figure 6: *GFP expressing cell fraction (%) in FaDu cells measured by flow cytometry 24 h after GFP gene transfer using (a) Lipofectamine™2000, (b) PEI/DNA complex, (c) PLGA-PEI/DNA nanoparticles and (d) PLGA/PEI-DNA nanoparticles with or without photoirradiation (n=9 ±SD).*

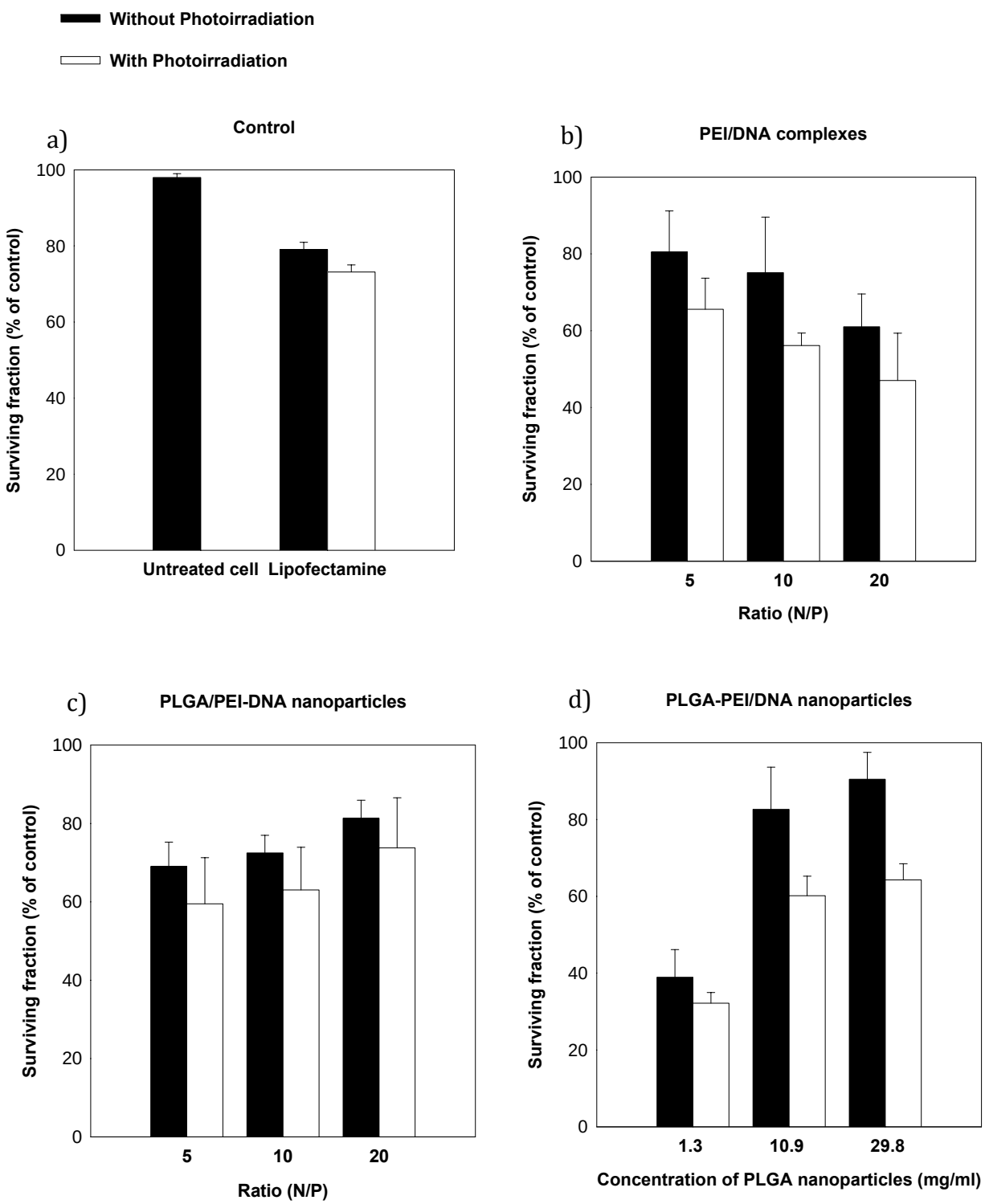


Figure 7: *Cytotoxicity of (a) Lipofectamine™2000, (b) PEI/DNA complex, (c) PLGA-PEI/DNA nanoparticles and (d) PLGA/PEI-DNA nanoparticles in FaDu cell lines with or without photoirradiation. Results are expressed as the fraction of surviving cells relative to untreated cells without photoirradiation (n=9 ± SD).*

4. Discussion

In recent years, biodegradable nanoparticles, based on PLGA and/or PEI polymers (Bivas-Benita et al., 2004; Kim et al., 2005; Park et al., 2008; Son and Kim, 2010; Takashima et al., 2007) have been developed for gene delivery.

In the present study, the transfection ability and cytotoxicity of PLGA/PEI nanoparticles adsorbing pDNA and PLGA nanoparticles adsorbing PEI/DNA complexes were evaluated. Furthermore, since PCI has been reported to enhance gene delivery (Bonsted et al., 2008; Nishiyama et al., 2005; Shieh et al., 2008), the impact of PCI onto pDNA delivery from both types of nanoparticles was also evaluated.

Since pDNA is a hydrophilic macromolecule, nanoparticles were prepared by the well-known double emulsion evaporation method (Park et al., 2008). PLGA nanoparticles are neutral or slightly electro-negatively charged particles. PLGA is a biodegradable polymer with two functional end groups i.e. hydroxyl and carboxylic group. The carboxylic functions can interact with the amine groups of PEI via an electrostatic interaction. Since cationic particles are known to improve oligonucleotides delivery, PEI was selected as the cationic polymer designed to be either incorporated or adsorbed in nanoparticles (Katas et al., 2009). Several studies have used PEI in PLGA particles to introduce cationic charges on the surface, which allows the oligonucleotides on the surface of the particles (Kim et al., 2005; Oster et al., 2005; Takashima et al., 2007). However, PEI had several drawbacks: it is generally cytotoxic for cell lines (Neu et al., 2005), the positive charge of PEI/DNA polyplexes engenders interactions with blood components (Rudolph et al., 2002; Zou et al., 2000) and active the complement system which results in rapid clearance of the complex from the bloodstream (Godbey and Mikos, 2001). Thus, the strategy was to use PLGA polymer to decrease cytotoxicity and to avoid these problems.

It is well known that particle size significantly affects the cellular uptake of nanoparticles and, in some cell lines only submicron size particles have been reported to efficient yield in gene transfer (Panyam and Labhasetwar, 2003). The mean diameter of nanoparticles incorporating PEI (PLGA/PEI nanoparticles) depends on the weight ratio of PLGA used during the formulation (Katas et al., 2009). The nanoparticles diameter was slightly decreased when PEI was incorporated into the matrix, and ranged from 380 to 320 nm for PLGA nanoparticles and PLGA/PEI nanoparticles (200 mg/mL of PEI), respectively. In previous study it was observed that the use of PEI in PLGA nanoparticles decreased the particle size with increasing the amount of PEI added (Takashima et al., 2007). When PEI/DNA complex was adsorbed onto the blank PLGA nanoparticles, there was also a slight trend in size reduction since the diameter was around 350 nm. Nevertheless, in both cases, the size difference was not statistically different ($p > 0.05$). Therefore, it was possible to compare transfection and toxicity results with nanoparticles of similar size allowing the size parameter not to influence the observed results.

The negative zeta potential of blank PLGA nanoparticles was attributed to the terminal carboxyl groups of PLGA. For PLGA/PEI nanoparticles, the zeta-potential of PLGA/PEI nanoparticles dramatically changed increasing PEI amounts in the PLGA/PEI formulations. The zeta-potential of the PLGA/PEI nanoparticles (5 mg/mL of PEI) was + 40 ± 2 mV. In the literature, similar results were obtained for PLGA-PEI nanoparticles using PVA (5% w/v). The particle surface charge was + 37.4 ± 1.0 mV (Katas et al., 2009). The positive charge was a result of the adsorption of PEI onto the surface of nanoparticles. The positively charged particle surface can facilitate adherence to negatively charged cellular membranes, thus inducing and increasing intracellular uptake (Mansouri et al., 2006).

In the case of PLGA-PEI/DNA nanoparticles, a constant amount of PEI/DNA complex (N/P = 20) was added. For the lowest concentration of PLGA nanoparticles (1.3 mg/mL), zeta

potential was around + 25 ± 7 mV. However, a constant value of around + 40 ± 3 mV was obtained for 5.0 to 29.8 mg/mL of PLGA nanoparticles concentrations.

In the PLGA-PEI/DNA complex nanoparticle solution, the zeta potential was positive and comparable to that of PEI/DNA due to possible attachment of PEI/DNA particles on the surface of PLGA nanoparticles (Chumakova et al., 2008).

EtBr assay was used to evaluate the zeta potential of PEI/DNA complex onto PLGA nanoparticles. According to EtBr assay, when PLGA nanoparticle concentration increased the percentage of the relative fluorescence decreased. This result might be explained due to the PEI/DNA complexes adsorption onto the PLGA nanoparticles. Incubation of plasmid with polylysine gave similar results by the reduction EtBr fluorescence (Chaszczewska-Markowska et al., 2004). For both type of nanoparticles, the system was very rapidly saturated with PEI/DNA complexes and the zeta potential reached the same value i.e. around + 40 ± 2 mV.

For PLGA/PEI nanoparticles, pDNA adsorption was determined by an agarose gel technique. For a 20/1 ratio, pDNA is totally adsorbed onto PLGA/PEI nanoparticles. This result suggests that the negatively charged pDNA gradually interacted with the cationic surface of PLGA/PEI nanoparticles up to this ratio. Following this ratio, the charge interactions achieved saturation conditions.

The release kinetic of the nanoparticles formulations was performed in a PBS buffer (pH 7.4). Indeed, the release kinetics and the transfection efficiency of pDNA might be influenced by the presence of PEI in the PLGA/PEI-DNA nanoparticles. In the case of PLGA-PEI/DNA nanoparticles, more than 35% of PEI/DNA complex was released within 4 hours, which means that transfection was due to the PEI/DNA complexes. In this case, it can be considered that nanoparticles target PEI/DNA complex to cells. For the PLGA/PEI-DNA nanoparticles, not more than 25% of pDNA was released after 4 hours and for up to 24 h. This slow release may explain

the lower transfection results observed with this type of nanoparticles. This result can be explain by the cationic nature of PEI that may retard pDNA release due to the electrostatic attractions between them (Son and Kim, 2010).

Transfection efficiency and cytotoxicity have been shown to be depending on the N/P ratios (PEI/DNA) (Godbey et al., 1999), and the photochemical internalisation (Berg et al., 1999). In our case, we have selected 3 ratios (N/P = 5, 10 or 20) where pDNA was totally complexed with PEI (data not shown).

For PLGA/PEI-DNA nanoparticles, the transfection efficiency was approximately 3%. The low transfection efficiency could be attributed to a low nanoparticles endocytosis from the nanoparticles. Similarly, Kim et al. (2005) evaluated ß-galactosidase transfection with the same type of PLGA/PEI nanoparticles and obtained transfection results of approximately 10%. Bivas-Benita et al. (2004) also reported that PLGA/PEI-DNA nanoparticles were taken up in Calu-3 cells. However, pDNA encoding for the GFP protein expression signal was rather low.

For PLGA-PEI/DNA nanoparticles, transfection efficiency were close to 70% for 1.3mg/ml of PLGA nanoparticles as observed for the PEI/DNA complexes (N/P=20). From the kinetic release result, we hypothesize that only PEI/DNA complexes are internalized in cells.

Cytotoxicity is also a critical issue that may affect transfection efficiency (Choi et al., 2006). Both types of nanoparticles were slightly less toxic than free PEI/DNA complexes: this result was more obvious for the N/P=20 ratio. Furthermore, higher PEI/DNA complexes ratio correlates with higher cytotoxicity. It was previously reported that cell toxicity can be reduced by using lower PEI/DNA ratio (Florea et al., 2002). In addition, when PEI was incorporated in the PLGA nanoparticles, the toxicity of PEI was decreased. In the literature, the effect of PEI and siRNA incorporation in PLGA nanoparticles on cytotoxicity was evaluated (Patil and Panyam, 2009): nanoparticle formulations were found to be non-toxic to the cells whereas free PEI was found to be highly toxic.

In this research, we also evaluated the combination of both type of nanoparticles with PCI on the transfection efficiency and the cytotoxicity. For PEI/DNA complexes and PLGA-PEI/DNA nanoparticles, PCI increase the efficiency of transfection. The mechanism of PCI is based on photochemical rupture of endocytotic vesicles after incubation of the cells with a photosensitizing compound which localizes to these vesicles, and irradiation at a wavelength specific to the photosensitizer [168]. We can hypothesize that PLGA nanoparticles can stimulate the binding of PEI/DNA to the cell membrane and the endocytosis. The toxicity of nanoparticles was increased by direct interaction with PCI. Although, the details of the interaction of PCI with the nanoparticles are still unclear.

In our case, GFP expression was found to be higher when PCI was applied with PEI/DNA complexes. For PLGA-PEI/DNA nanoparticles, PCI improved significantly the transfection efficiency for the 1.3 and 10.9 mg/mL nanoparticle concentrations ($p< 0.05$). These findings suggest that the combination of the nanoparticle with PCI is an efficient tool for gene delivery. However, for the PLGA/PEI-DNA nanoparticles the transfection efficiency decreased with PCI. These results might be explained as follows: PCI damage can explain the decrease in transfection seen after PCI with some cationic lipid transfection agents. This indicates that photochemical damage may be more important for some transfection agents than for others, either because some complexes are located closer to the sensitiser, or because different complexing agents protect the DNA from damage to a different extent. The importance of photochemical damage for the overall efficiency of PCI-mediated drug delivery is not known and will probably vary substantially with the molecule to be internalised, and may be also with the photosensitiser used [165].

5. Conclusion

From this research, PEI has been shown to have the ability to deliver pDNA into cells. Modification of PLGA nanoparticles by incorporating PEI or adsorbing PEI/DNA complexes onto nanoparticles has led the formation of a delivery system for pDNA. PCI was found to slightly improve the transfection efficiency for all formulations.

References

Berg, K., Dietze, A., Kaalhus, O., Hogset, A., 2005. Site-specific drug delivery by photochemical internalization enhances the antitumor effect of bleomycin. Clin Cancer Res 11, 8476-8485.

Berg, K., Selbo, P.K., Prasmickaite, L., Tjelle, T.E., Sandvig, K., Moan, J., Gaudernack, G., Fodstad, O., Kjolsrud, S., Anholt, H., Rodal, G.H., Rodal, S.K., Hogset, A., 1999. Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. Cancer Res 59, 1180-1183.

Bivas-Benita, M., Romeijn, S., Junginger, H.E., Borchard, G., 2004. PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. Eur J Pharm Biopharm 58, 1-6.

Bonsted, A., Engesaeter, B.O., Hogset, A., Maelandsmo, G.M., Prasmickaite, L., Kaalhus, O., Berg, K., 2004. Transgene expression is increased by photochemically mediated transduction of polycation-complexed adenoviruses. Gene Ther 11, 152-160.

Bonsted, A., Wagner, E., Prasmickaite, L., Hogset, A., Berg, K., 2008. Photochemical enhancement of DNA delivery by EGF receptor targeted polyplexes. Methods Mol Biol 434, 171-181.

Budker, V., Zhang, G., Knechtle, S., Wolff, J.A., 1996. Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. Gene Ther 3, 593-598.

Chaszczewska-Markowska, M., Ugorski, M., Langner, M., 2004. Plasmid condensation induced by cationic compounds: hydrophilic polylysine and amphiphilic cationic lipid. Cell Mol Biol Lett 9, 3-13.

Choi, J.S., Ko, K.S., Park, J.S., Kim, Y.H., Kim, S.W., Lee, M., 2006. Dexamethasone conjugated poly(amidoamine) dendrimer as a gene carrier for efficient nuclear translocation. Int J Pharm 320, 171-178.

Chumakova, O.V., Liopo, A.V., Andreev, V.G., Cicenaite, I., Evers, B.M., Chakrabarty, S., Pappas, T.C., Esenaliev, R.O., 2008. Composition of PLGA and PEI/DNA nanoparticles improves ultrasound-mediated gene delivery in solid tumors in vivo. Cancer Lett 261, 215-225.

Cohen, H., Levy, R.J., Gao, J., Fishbein, I., Kousaev, V., Sosnowski, S., Slomkowski, S., Golomb, G., 2000. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. Gene Ther 7, 1896-1905.

Dietze, A., Bonsted, A., Hogset, A., Berg, K., 2003. Photochemical internalization enhances the cytotoxic effect of the protein toxin gelonin and transgene expression in sarcoma cells. Photochem Photobiol 78, 283-289.

Elfinger, M., Pfeifer, C., Uezguen, S., Golas, M.M., Sander, B., Maucksch, C., Stark, H., Aneja, M.K., Rudolph, C., 2009. Self-assembly of ternary insulin-polyethylenimine (PEI)-DNA nanoparticles for enhanced gene delivery and expression in alveolar epithelial cells. Biomacromolecules 10, 2912-2920.

Fay, F., Quinn, D.J., Gilmore, B.F., McCarron, P.A., Scott, C.J., 2010. Gene delivery using dimethyldidodecylammonium bromide-coated PLGA nanoparticles. Biomaterials 31, 4214-4222.

Florea, B.I., Meaney, C., Junginger, H.E., Borchard, G., 2002. Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. AAPS PharmSci 4, E12.

Folini, M., Berg, K., Millo, E., Villa, R., Prasmickaite, L., Daidone, M.G., Benatti, U., Zaffaroni, N., 2003. Photochemical internalization of a peptide nucleic acid targeting the catalytic subunit of human telomerase. Cancer Res 63, 3490-3494.

Godbey, W.T., Mikos, A.G., 2001. Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. J Control Release 72, 115-125.

Godbey, W.T., Wu, K.K., Mikos, A.G., 1999. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. J Biomed Mater Res 45, 268-275.

Ho, J., Wang, H., Forde, G.M., 2008. Process considerations related to the microencapsulation of plasmid DNA via ultrasonic atomization. Biotechnol Bioeng 101, 172-181.

Hogset, A., Prasmickaite, L., Selbo, P.K., Hellum, M., Engesaeter, B.O., Bonsted, A., Berg, K., 2004. Photochemical internalisation in drug and gene delivery. Adv Drug Deliv Rev 56, 95-115.

Katas, H., Cevher, E., Alpar, H.O., 2009. Preparation of polyethyleneimine incorporated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles by spontaneous emulsion diffusion method for small interfering RNA delivery. Int J Pharm 369, 144-154.

Kim, I.S., Lee, S.K., Park, Y.M., Lee, Y.B., Shin, S.C., Lee, K.C., Oh, I.J., 2005. Physicochemical characterization of poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles with polyethylenimine as gene delivery carrier. Int J Pharm 298, 255-262.

Kim, W.J., Chang, C.W., Lee, M., Kim, S.W., 2007. Efficient siRNA delivery using water soluble lipopolymer for anti-angiogenic gene therapy. J Control Release 118, 357-363.

Kumar, M.N., Mohapatra, S.S., Kong, X., Jena, P.K., Bakowsky, U., Lehr, C.M., 2004. Cationic poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as efficient in vivo gene transfection agents. J Nanosci Nanotechnol 4, 990-994.

Liu, L., Xu, H.M., Jiang, H., Wang, J., Song, N., Xie, J.X., 2010. Recombinant adenovirus-mediated expression of GHS-R1a in HEK 293 cells. Neurosci Bull 26, 225-231.

Mansouri, S., Cuie, Y., Winnik, F., Shi, Q., Lavigne, P., Benderdour, M., Beaumont, E., Fernandes, J.C., 2006. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. Biomaterials 27, 2060-2065.

Ndoye, A., Bouali, S., Dolivet, G., Leroux, A., Erbacher, P., Behr, J.P., Berg, K., Guillemin, F., Merlin, J.L., 2004a. Sustained gene transfer and enhanced cell death following glucosylated-PEI-mediated p53 gene transfer with photochemical internalisation in p53-mutated head and neck carcinoma cells. Int J Oncol 25, 1575-1581.

Ndoye, A., Dolivet, G., Hogset, A., Leroux, A., Fifre, A., Erbacher, P., Berg, K., Behr, J.P., Guillemin, F., Merlin, J.L., 2006. Eradication of p53-mutated head and neck squamous cell carcinoma xenografts using nonviral p53 gene therapy and photochemical internalization. Mol Ther 13, 1156-1162.

Ndoye, A., Merlin, J.L., Leroux, A., Dolivet, G., Erbacher, P., Behr, J.P., Berg, K., Guillemin, F., 2004b. Enhanced gene transfer and cell death following p53 gene transfer using photochemical internalisation of glucosylated PEI-DNA complexes. J Gene Med 6, 884-894.

Neu, M., Fischer, D., Kissel, T., 2005. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. J Gene Med 7, 992-1009.

Nishiyama, N., Iriyama, A., Jang, W.D., Miyata, K., Itaka, K., Inoue, Y., Takahashi, H., Yanagi, Y., Tamaki, Y., Koyama, H., Kataoka, K., 2005. Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer. Nat Mater 4, 934-941.

Niu, X., Zou, W., Liu, C., Zhang, N., Fu, C., 2009. Modified nanoprecipitation method to fabricate DNA-loaded PLGA nanoparticles. Drug Dev Ind Pharm 35, 1375-1383.

Niven, R., Zhang, Y., Smith, J., 1997. Toward development of a non-viral gene therapeutic. Adv Drug Deliv Rev 26, 135-150.

O'Rorke, S., Keeney, M., Pandit, A., 2010. Non-viral polyplexes: Scaffold mediated delivery for gene therapy. Progress in Polymer Science 35, 441-458.

Oliveira, A.C., Ferraz, M.P., Monteiro, F.J., Simoes, S., 2009. Cationic liposome-DNA complexes as gene delivery vectors: Development and behaviour towards bone-like cells. Acta Biomater 5, 2142-2151.

Oster, C.G., Kim, N., Grode, L., Barbu-Tudoran, L., Schaper, A.K., Kaufmann, S.H., Kissel, T., 2005. Cationic microparticles consisting of poly(lactide-co-glycolide) and polyethylenimine as carriers systems for parental DNA vaccination. J Control Release 104, 359-377.

Panyam, J., Labhasetwar, V., 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. Adv Drug Deliv Rev 55, 329-347.

Panyam, J., Zhou, W.Z., Prabha, S., Sahoo, S.K., Labhasetwar, V., 2002. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. FASEB J 16, 1217-1226.

Park, Y.M., Shin, B.A., Oh, I.J., 2008. Poly(L-lactic acid)/polyethylenimine nanoparticles as plasmid DNA carriers. Arch Pharm Res 31, 96-102.

Patil, Y., Panyam, J., 2009. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. Int J Pharm 367, 195-203.

Rhaese, S., von Briesen, H., Rubsamen-Waigmann, H., Kreuter, J., Langer, K., 2003. Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery. J Control Release 92, 199-208.

Rudolph, C., Schillinger, U., Plank, C., Gessner, A., Nicklaus, P., Müller, R.H., Rosenecker, J., 2002. Nonviral gene delivery to the lung with copolymer-protected and transferrin-modified polyethylenimine. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects 1573, 75-83.

Sahoo, S.K., Panyam, J., Prabha, S., Labhasetwar, V., 2002. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. J Control Release 82, 105-114.

Shieh, M.J., Peng, C.L., Lou, P.J., Chiu, C.H., Tsai, T.Y., Hsu, C.Y., Yeh, C.Y., Lai, P.S., 2008. Non-toxic phototriggered gene transfection by PAMAM-porphyrin conjugates. J Control Release 129, 200-206.

Singh, M., Briones, M., Ott, G., O'Hagan, D., 2000. Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 811-816.

Son, S., Kim, W.J., 2010. Biodegradable nanoparticles modified by branched polyethylenimine for plasmid DNA delivery. Biomaterials 31, 133-143.

Takashima, Y., Saito, R., Nakajima, A., Oda, M., Kimura, A., Kanazawa, T., Okada, H., 2007. Spray-drying preparation of microparticles containing cationic PLGA nanospheres as gene carriers for avoiding aggregation of nanospheres. Int J Pharm 343, 262-269.

Wang, K., Cheng, L., Liang, Y., Liu, D., Li, K., Wang, P., 2010. Adenovirus-mediated delivery of shRNA against bFGF mRNA suppresses growth of cultured human primary prostatic stromal cells. Mol Biol Rep.

Wolfe, D., Craft, A.M., Cohen, J.B., Glorioso, J.C., 2010. An HSV Vector System for Expression of Complex Cellular cDNA Libraries. J Virol 84, 7360-7368.

Xiao, W., Chen, X., Yang, L., Mao, Y., Wei, Y., Chen, L., 2010. Co-delivery of doxorubicin and plasmid by a novel FGFR-mediated cationic liposome. Int J Pharm 393, 119-126.

Yang, S.J., Chang, S.M., Tsai, K.C., Chen, W.S., Lin, F.H., Shieh, M.J., 2010. Effect of chitosan-alginate nanoparticles and ultrasound on the efficiency of gene transfection of human cancer cells. J Gene Med 12, 168-179.

Zou, S.M., Erbacher, P., Remy, J.S., Behr, J.P., 2000. Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. J Gene Med 2, 128-134.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les nanoparticules et microparticules ont aujourd'hui trouvé leur place en tant que vecteur pour introduire l'ADN dans une cellule comme en témoigne l'augmentation importante de publications sur le sujet lors de ces dernières années [123, 129, 132, 183]. Elles ont, en effet, l'avantage, en fonction de leur composition, de maintenir leurs structures particulaires pendant une longue période, de pouvoir être administrées par différentes voies (orale, sous-cutanée, intramusculaire), et d'être également adaptées à la production industrielle.

L'objectif des travaux sur les nano- et les microparticules vecteurs d'ADN retrouvés dans la littérature est d'élaborer des particules capables:

- de véhiculer des acides nucléiques (ADN ou ARN) au cœur de la cellule [183]. La machinerie cellulaire est alors utilisée pour permettre l'expression de la protéine pour laquelle ce gène code et ainsi permettre son action thérapeutique (*Figure 23*).
- de protéger l'ADN ou l'ARN de la dégradation dans les milieux biologiques (notamment une dégradation enzymatique). Deux possibilités ont été décrites pour cela : l'encapsulation de l'ADN dans les particules ou l'adsorption à leur surface.

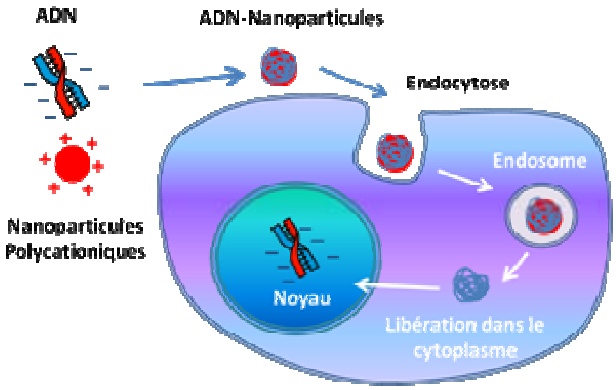


Figure 23 : Les différentes étapes du transfert de gènes dans une cellule cible. (1) complexation de l'ADN avec le vecteur, (2) passage de la membrane cytoplasmique par endocytose, (3) circulation du cytoplasme vers le noyau, (4) passage de l'enveloppe nucléaire.

Notre projet de thèse visait à développer un « outil-vecteur d'ADN » à base de particules polymériques solides, adapté aux exigences de la transfection, présentable sous forme stable et directement utilisable au chevet du patient (tel que l'avait envisagé Mohammed AR et coll. (2006) avec des liposomes lyophilisés et stérilisés) [184]. Cet « outil–vecteur d'ADN » pourrait alors être utilisé aussi bien en thérapie anticancéreuse que pour traiter des maladies génétiques. Nous avons d'abord formulé un outil capable de véhiculer l'ADN, puis évalué sa toxicité et son efficacité sur des cultures cellulaires. Toute la difficulté de ce projet consistait à trouver un compromis entre une cytotoxicité minimum et une efficacité de transfection maximale.

1 DÉVELOPPEMENT D'UN « OUTIL-VECTEUR D'ADN MÉDICAMENT ».

1.1 LE CAHIER DES CHARGES ET LES PARAMÈTRES DE FORMULATIONS CHOISIS.

1.1.1 LES POLYMÈRES POLYCATIONIQUES UTILISÉS.

L'utilisation de polymères polycationiques nous a paru judicieuse pour permettre l'association des particules aux molécules d'ADN via des interactions électrostatiques. Comme nous l'avons largement mentionné dans la revue bibliographique, plusieurs polymères polycationiques ont déjà été utilisés. Notre choix s'est orienté vers deux stratégies différentes :

- Notre première approche a consisté à utiliser des polyméthacrylates de type Eudragit® qui sont des polymères biocompatibles « naturellement » chargés positivement par la présence de groupements ammonium quaternaire. Dans la littérature, les premiers résultats de particules pour le transfert d'acide nucléiques composées de polymères méthacryliques ont été publiés par Esposito et coll. (1999); et par Cortesi et coll. (2004). Ces deux études ont montré une adsorption efficace de l'ADN sur des particules composées d'Eudragit® RS 100, une protection de l'ADN contre les nucléases, mais également un taux de transfection similaire

voire supérieur à la Lipofectine [174, 185]. Nous avons choisi de travailler avec les Eudragit® RS et RL qui se différencient uniquement par leur teneur en groupements ammonium quaternaires qui atteint respectivement 0,5 à 0,8% et 0,8 à 1,2%, ce qui confère à l'Eudragit® RL un plus grand nombre d'interactions potentielles avec l'ADN (*Figure 24*). L'utilisation d'un polymère non biodégradable pour le transfert de gène peut être certes critiquée, mais une balance entre le bénéfice d'un bon taux de transfection et le risque de toxicité dû à une accumulation du polymère peut être discutée.

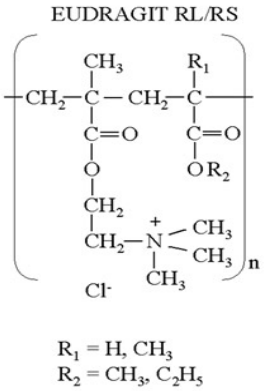


Figure 24 : Structure chimique de l'Eudragit® RS et RL.

➢ La seconde approche que nous avons envisagée est d'utiliser un polymère à la fois parfaitement biocompatible et biodégradable de type copolymère d'acide lactique et glycolique (PLGA 503H). Ce polymère étant légèrement chargé négativement, nous l'avons associé à la PLL ou la PEI qui sont des polymères classiquement utilisés en transfection et porteurs de nombreuses charges positives [186-188]. Cette association de polymères polycationiques avec le PLGA est réalisée durant le procédé de formulation, ou lors de l'adsorption avec l'ADN. Ainsi, le chapitre 3 décrit le développement de particules constituées de PLGA et de PEI, et de particules de PLGA sur lesquelles des complexes PEI/ADN sont adsorbés. Une autre étude que nous avons menée en parallèle a été de « remplacer » la PEI par la PLL.

Pour étudier l'association entre le PLGA et la PEI ou la PLL, nous avons déterminé la quantité de PEI ou de PLL réellement présente dans les vecteurs à l'issue de la formulation. Pour cela, nous avons mis au point une technique d'extraction[1] de la PEI, basée sur les données de solubilité de la PEI dans l'eau et différents solvants [189]. Cette méthode d'extraction de la PEI n'a, à notre connaissance, jamais été décrite dans la littérature. Après extraction de la PEI des nanoparticules PLGA/PEI (10 mg), le taux de PEI présent au sein des nanoparticules atteint 50%, ce qui est favorable à une forte interaction avec l'ADN. De plus, nous n'avons pas pu obtenir d'informations sur la quantité de PLL réellement présente dans les particules de PLGA/PLL. Un dosage de la quantité de PLL présente dans le surnageant des nanoparticules après centrifugation (donc de la PLL non « encapsulée ») par la méthode de « microBCA » a été réalisé mais il ne nous a pas permis de dégager une valeur. Une interférence importante sur le dosage est visible, liée à la présence d'une grande quantité de tensioactif (alcool polyvinylique à 5% m/v) nécessaire lors de la formulation.

[1]Brièvement, 10 mg de nanoparticules PLGA/PEI préalablement lyophilisées sont dissouts dans la triacétine, solvant non miscible à l'eau mais permettant la dissolution du PLGA. Après dissolution des particules, 10 ml d'eau sont ajoutés au mélange afin d'extraire la PEI, qui est hydrosoluble et donc récupérée dans l'eau après une nuit d'extraction. Après deux cycles d'extractions successifs, la PEI est dosée grâce à une technique colorimétrique et spectrophotométrique (à 275 nm) décrite par Ungaro et coll. [190], et l'établissement d'une gamme d'étalonnage contenant de la PEI en présence de cuivre. Ce dosage a été réalisé pour des nanoparticules constituées à partir de 5 mg/mL (n=3). Pour les formulations de PLGA/PEI préparées avec des quantités supérieures de PEI, nous n'avons pas pu déterminer la quantité de PEI encapsulée. Un précipité blanc apparait dans la phase aqueuse, interférant dans le dosage de la PEI. Afin d'améliorer l'efficacité d'extraction, différents ratios de triacetine/eau ont été testés avec les formulations contenant plus de PEI. Un témoin contenant uniquement 250 µg de PEI, et un témoin constitué de nanoparticules de PLGA uniquement ont été également réalisés.

Quantité de PEI après extraction des nanoparticules de PLGA/PEI (10mg).

	Témoin PEI (250 µg)	**PLGA/PEI**	**Témoin PLGA**
Quantité de PEI après extraction (µg)	210 ± 3	115 ± 9	0

1.1.2 L'ASSOCIATION À L'ADN

L'ADN est ensuite associé à ces polymères. Nous avons choisi d'utiliser le gène codant la « green fluorescent protein » (GFP) inclus dans un plasmide (pGFP-C3) pour les raisons évoqués dans le chapitre 2.1 de l'étude expérimentale.

Nous avons testé les deux possibilités d'association de l'ADN sur les vecteurs polymériques qui ont été décrites dans la littérature : l'encapsulation [117, 127] et l'adsorption [135, 191]. Si l'encapsulation apporte une protection plus importante des acides nucléiques véhiculés vis-à-vis des enzymes, l'adsorption permet, quant à elle, une libération de la macromolécule plus aisée [191]. Nous nous sommes tout d'abord tournés vers l'encapsulation du plasmide pEGF-C3. Des essais de formulation de particules à base d'Eudragit® RS ont été effectués. Afin de vérifier que les procédés de simple et de double émulsion - évaporation de solvant n'altéraient pas le plasmide, une migration sur gel d'agarose de l'ADN non encapsulé (présent dans le surnageant des particules) a été réalisée (*Figure 25*).

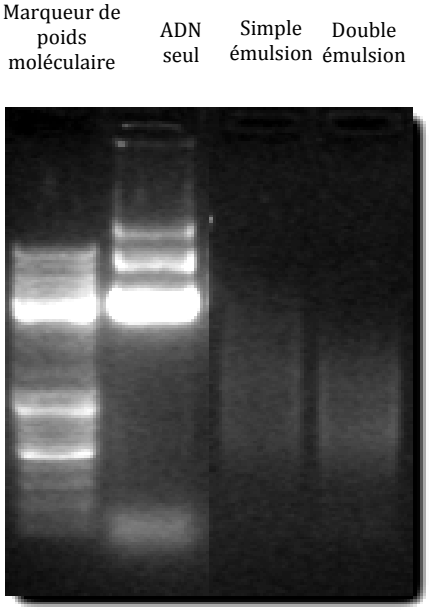


Figure 25 : Migration sur gel d'agarose (0,8%(m/v) ; 90 V/cm) des plasmides libres présents dans les surnageants de particules d'Eudragit RS formulées par simple et double émulsion – évaporation de solvant. La présence d'une traînée témoigne de la dégradation de l'ADN lors du procédé de formulation.

Cette étude montre une dégradation de l'ADN (présence d'une trainée sans bandes bien différenciées), et ce malgré les précautions prises lors de la formulation (expérience réalisée sur un lit de glace, migration effectuée juste après la formulation, durée de sonication réduits à leur minimum…). Les étapes de sonication nécessaires à l'émulsification peuvent être, à notre avis, le facteur principalement responsable de cette dégradation de l'ADN, comme cela a déjà été évoqué précédemment [127, 192, 193]. Face à ces essais d'encapsulation infructueux, nous avons préféré adsorber l'ADN en surface des particules de polymères.

1.1.3 UN PROCÉDÉ SIMPLE DE FORMULATION

Les vecteurs non viraux à base de nano- ou microparticules de polymères proposés dans la littérature pour la transfection de cellules sont formulés selon différents procédés, allant de technique nécessitant un équipement lourd mais facilement industrialisable (comme la méthode de « spray-drying » [194]) à des techniques plus faciles à mettre en œuvre en laboratoire, à petite échelle comme la double émulsion - évaporation de solvant [195]. Cette dernière technique de double émulsion - évaporation du solvant ainsi que la nanoprécipitation sont utilisées au cours de notre étude. La première méthode est classiquement utilisée pour l'encapsulation de molécules hydrophiles [196]. La seconde est connue pour permettre l'obtention de particules de petite taille [171]. L'organisation des polymères dans la structure particulaire, les tensioactifs utilisés dans ces deux techniques étant différents, il nous a semblé judicieux de comparer les paramètres physicochimiques et l'efficacité des deux types de vecteurs à adsorber le plasmide pEGFP-C3.

1.1.4 DES TAILLES DE PARTICULES COMPATIBLES AVEC LA TRANSFECTION.

L'obtention de particules de taille compatible avec la transfection étant primordiale, c'est naturellement le premier paramètre de formulation que nous avons contrôlé par diffusion dynamique de la lumière (Zetasizer 3000, Malvern Instrument). En effet, dans la littérature, les nanoparticules de petites tailles sont mieux internalisées par les cellules [115, 119, 197].

Dans notre étude, les nanoparticules d'Eudragit® RS et RL présentent une taille inférieure à 100 nm lorsqu'elles sont formulées par nanoprécipitation et une taille avoisinant 350 nm par le procédé de double émulsion – évaporation de solvant. Cette même taille est observée pour les particules à base de PLGA, formulées exclusivement par double émulsion – évaporation de solvant. Cependant, en présence des polymères polycationiques, PEI et PLL, les particules de PLGA présentent une taille variable. L'association de la PEI dans la formulation se traduit, en effet, par une diminution de la taille des nanoparticules : plus la quantité de PEI augmente (5 mg/ml à 200 mg/ml), plus cette diminution est marquée, jusqu'à obtenir des diamètres d'environ 320 nm. En revanche, la PLL ne présente pas ces propriétés puisqu'une légère augmentation de taille (de 380 nm à 420 nm) a été observée pour les nanoparticules de PLGA associées à la PLL à la concentration de 5 mg/mL.

Ainsi l'ensemble des particules de polymères formulées présentent des tailles compatibles avec la transfection de gène et permettent, ainsi, sur la base de ce critère, de comparer les deux procédés de formulation que nous avons choisis.

1.1.5 UNE ADSORPTION EFFICACE DE L'ADN OU DES COMPLEXES POLYMÈRES POLYCATIONIQUES/ADN

Comme nous l'avons mentionné précédemment, certaines des particules formulées sont capables d'adsorber directement le plasmide (chargé négativement) par des liaisons

électrostatiques (de par leurs charges positives). D'autres particules, de charge globale proche de la neutralité, peuvent en revanche interagir avec un complexe PEI/ADN ou PLL/ADN préalablement constitué. Pour évaluer cette potentialité d'adsorption, la taille et surtout la charge des particules sont suivies après 30 min d'incubation en présence du plasmide ou des complexes (Zetasizer 3000, Malvern Instrument). La présence d'ADN n'a pas modifié significativement le diamètre des vecteurs formulés. Les résultats de potentiel zêta figurent dans le *tableau 9*.

	Eudragit RS		**Eudragit RL**		**PLGA/PEI**		**PLGA/PLL**		**PLGA – PEI/ADN**		**PLGA – PLL/ADN**	
Sans /avec ADN	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**
Potentiel zêta (mV)	(+) 47±8	(-) 17± 2	(+) 58±4	(-) 43± 3	(+) 40±3	(-) 7±5	(+) 3.2±0.9	ND	(-) 26±2	(+) 40±7	(-) 26±2	(+) 3 ± 2

Tableau 9 : Potentiel zêta des différents types de vecteurs d'ADN (n=3 ; ND : non déterminé).

Le potentiel zêta des nanoparticules constituées uniquement d'Eudragit® RS, RL et de PLGA est de respectivement +58 mV, +47 mV et -26 mV. Conformément à nos attentes, une efficacité d'adsorption du plasmide codant pour la GFP sur les nanoparticules d'Eudragit (RS ou RL) est mise en évidence par une diminution du potentiel zêta : de +47 mV à – 17 mV pour l'Eudragit® RS et de +58 mV à – 43 mV pour l'Eudragit® RL. Cette interaction Eudragit® / ADN est due à l'établissement de liaisons électrostatiques entre les groupements ammonium quaternaire des Eudragit® et les groupements phosphate de l'ADN. Plusieurs quantités de particules ont été évaluées : 500 µg/mL de particules d'Eudragit RS et d'Eudragit RL sont nécessaires pour complexer la totalité des 4 µg d'ADN plasmidique.

Lors de la formulation de particules PLGA/PEI, le potentiel zêta augmente avec la quantité de PEI utilisée jusqu'à obtenir un plateau vers +40 mV (pour une concentration en PEI supérieure

à 5 mg/mL). En revanche, le potentiel zêta des particules de PLGA/PLL demeure proche de la neutralité : -2.5 ± 1.5 mV pour les particules à partir de 1 mg/mL de PLL et +3.2 ± 0.9mV pour celles à partir de 5 mg/mL de PLL. Cette charge étant trop faiblement positive, pour permettre l'adsorption d'ADN, nous n'avons pas donné suite à ce vecteur PLGA/PLL-ADN.

Par contre, en présence d'ADN (4µg), les particules de PLGA/PEI ont vu leur potentiel zêta diminuer : de + 40 mV à environ -7 mV, témoignant ainsi de l'adsorption de l'ADN.

En ce qui concerne les particules de PLGA sur lesquelles les complexes PEI/ADN ou PLL/ADN sont adsorbés, plusieurs mises au point préalables se sont imposées pour permettre l'utilisation de la quantité la plus faible possible en particules pour véhiculer la dose d'ADN efficace que l'on s'était fixé : 4 µg. En effet, cette dose de 4µg correspond à une quantité d'ADN plasmidique souvent utilisée dans la littérature [198-200].

Ainsi, dans un premier temps nous avons déterminé le ratio « polymère polycationique (PEI ou PLL)/ADN » qui permet l'association de la totalité des 4µg d'ADN, révélateur de l'association et du nombre d'interactions possibles avec l'ADN. A la vue des résultats par fluorimétrie (diminution de l'incorporation du bromure d'éthidium en présence des polymères PEI ou PLL) et des observations sur gel d'agarose (l'ADN ne migre pas dans le gel lorsqu'il y a association avec les PEI ou la PLL) (*Figure 26*), la totalité des 4 µg d'ADN se trouve associée à la PEI et à la PLL dès le ratio N/P égal à 1.

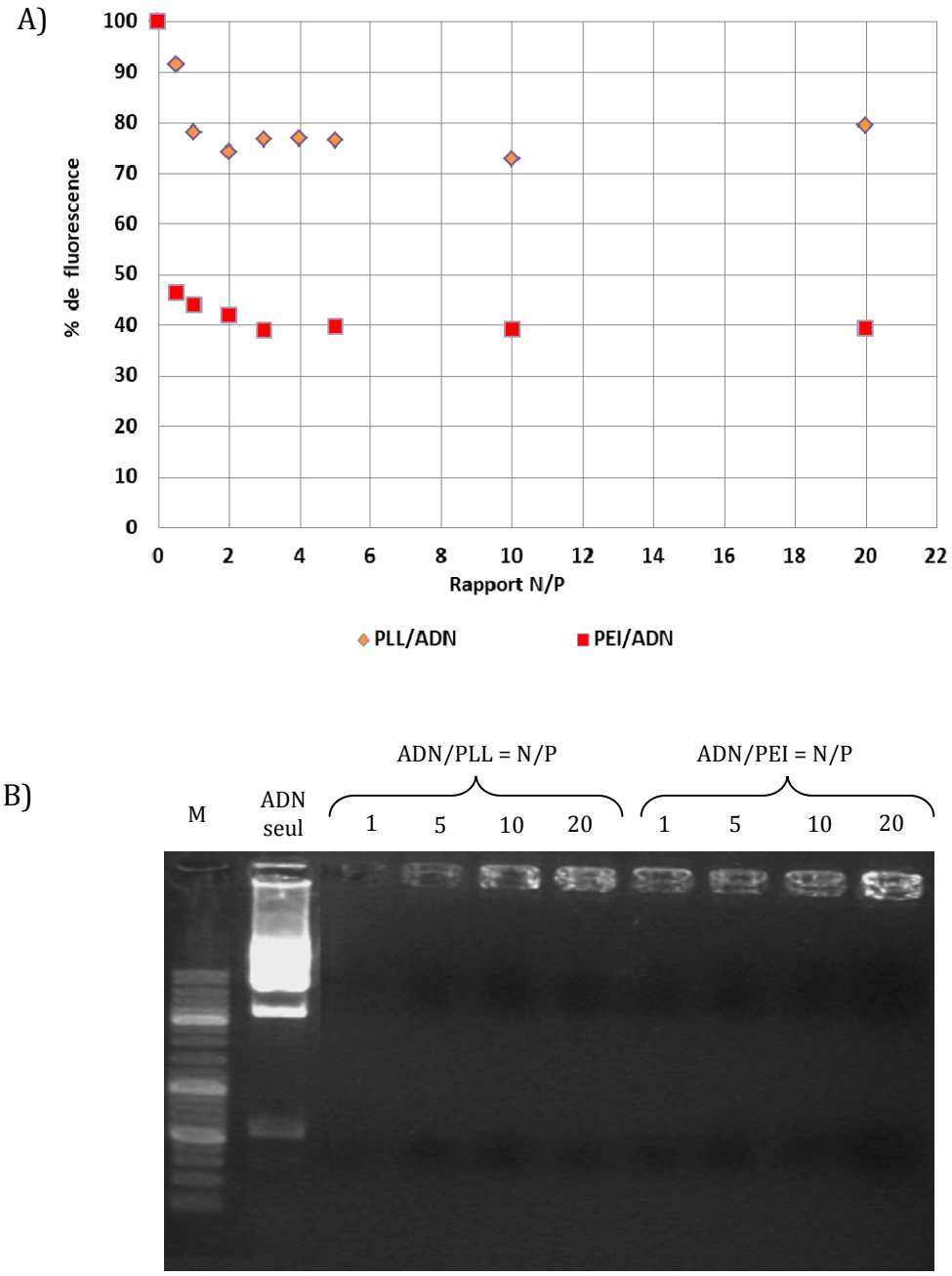


Figure 26 : Mise en évidence de la formation des complexes polymères polycationiques (PEI ou PLL) / ADN par l'extinction de la fluorescence induite par le bromure d'éthidium en présence d'un complexe (A) et par l'observation sur un gel d'agarose (B).

Une fois les complexes ainsi optimisés, nous avons déterminé le ratio « PLGA / complexe » qui permet l'association de la totalité des complexes utilisés. Les mesures de potentiel zêta présentées dans le *tableau 9* permettent de le confirmer. Le potentiel zêta augmente en présence des complexes : de -26 mV à + 40 mV pour les particules de PLGA–PEI/ADN et de -26 mV à + 3 mV pour les particules de PLGA–PLL/ADN. En effet, des interactions électrostatiques entre les quelques charges négatives du PLGA et les groupements positifs de la PEI ou de la PLL complexées à l'ADN peuvent se constituer et entraînent donc cette modification de la charge de surface observée. Pour vérifier ce résultat, une détection des complexes PEI/ADN ou PLL/ADN non adsorbés a été initiée, dans le surnageant de la formulation des vecteurs ainsi formés. Une diminution de la fluorescence est observée, ce qui correspond à une adsorption des complexes PLL/ADN ou PEI/ADN sur les nanoparticules de PLGA. Une concentration en nanoparticules de PLGA de 1,3 mg/ml permettant d'adsorber la totalité du complexe PLL/ADN ou PEI/ADN dès 1h d'incubation.

1.1.6 DES VECTEURS PEU CYTOTOXIQUES ET EFFICACES EN TRANSFECTION : UN JUSTE ÉQUILIBRE À TROUVER.

Les deux derniers critères du cahier des charges que nous nous étions fixé correspondent à une faible cytotoxicité évaluée sur différents types cellulaires et, bien évidemment, une efficacité de transfection comparable à celle obtenue avec la lipofectamine très largement utilisée pour la transfection des cellules eucaryotes [201].

Les deux phénomènes « cytotoxicité » et « transfection » sont en effet liés car l'internalisation du vecteur, du complexe ou éventuellement de l'ADN libre, entraîne des perturbations des membranes (notamment la membrane plasmique) et risque, par conséquent d'entraîner une mort cellulaire. Les vecteurs que nous avons développés présentent donc une certaine cytotoxicité qui dépend des doses utilisées sachant qu'en général, les doses efficaces en

transfection entrainent souvent une mortalité cellulaire. Toute la difficulté de ce projet consiste donc à trouver un compromis entre une cytotoxicité minimale et une efficacité de transfection maximale.

Les études de transfection et de cytotoxicité des premiers vecteurs (nanoparticules d'Eudragit® RS et RL) ont été tout d'abord effectuées sur différents types cellulaires : une lignée de cellules cancéreuses du sein non métastasiques (MCF-7) et, métastasiques (MDA MB-231), ainsi qu'une lignée de cellules cancéreuses du pharynx (FaDu). Ce sont des cellules qui présentent une efficacité de transfection différente selon leurs capacités prolifératives ou migratrices. C'est le cas en particulier des cellules MCF-7 qui sont plus facilement transfectables que les cellules MDA-MB231, car ces dernières sont très migratrices, ce qui rend plus difficile l'activité des agents de transfection couramment utilisés [202, 203]. Les taux de transfection les plus élevés (70%) sont obtenus sur les cellules FaDu. Les *figures 27 et 28* résument les principaux résultats obtenus sur cette lignée cellulaire pour les vecteurs développés lors de ce travail.

Ces vecteurs permettent d'augmenter l'efficacité de transfection en comparaison à l'ADN libre *(Figure 27)*, comme cela a été largement évoqué dans la revue bibliographique. De plus, les résultats obtenus avec les particules d'Eudragit® RS et RL (6 à 7%) se rapprochent de ceux obtenus avec la lipofectamine (15%) dans notre étude mais aussi dans la littérature [204, 205]. Les taux de transfection les plus élevés que nous avons obtenus sont observés en utilisant les particules de PLGA sur lesquelles les complexes PEI/ADN et PLL/ADN sont adsorbés (respectivement 60% et 30%). Les pourcentages atteints sont respectivement 4 fois et 2 fois supérieurs à ceux obtenus avec la lipofectamine. Cependant, il est à noter que les quantités de nanoparticules mises en contact des cellules FaDu sont totalement différentes. Ainsi, les taux de transfection les plus élevés obtenus avec les particules d'Eudragit® RS et RL le sont pour des

quantités en particules environ 10 et 5 fois inférieures à celles déposées pour atteindre les taux de transfection avec des particules à base de PLGA. Les conséquences de la transfection sur la viabilité cellulaire est visible sur la *figure 28*.

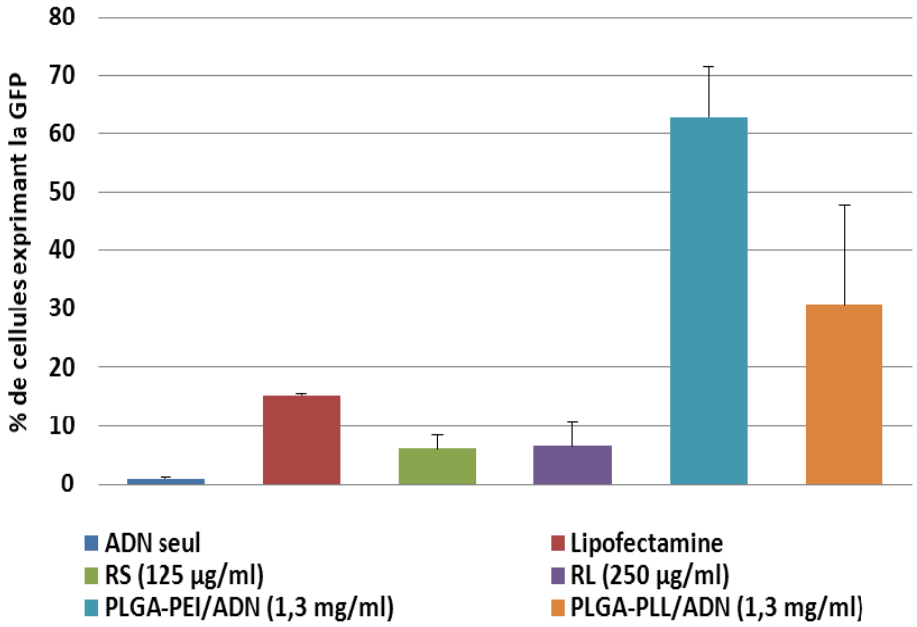


Figure 27 : Etude de la transfection des cellules FaDu par le gène rapporteur codant pour la GFP véhiculé par les différentes nanoparticules formulées par le procédé de double émulsion – évaporation de solvant. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules fluorescentes détectées par cytométrie en flux (moyenne ± écart-type ; n=4)

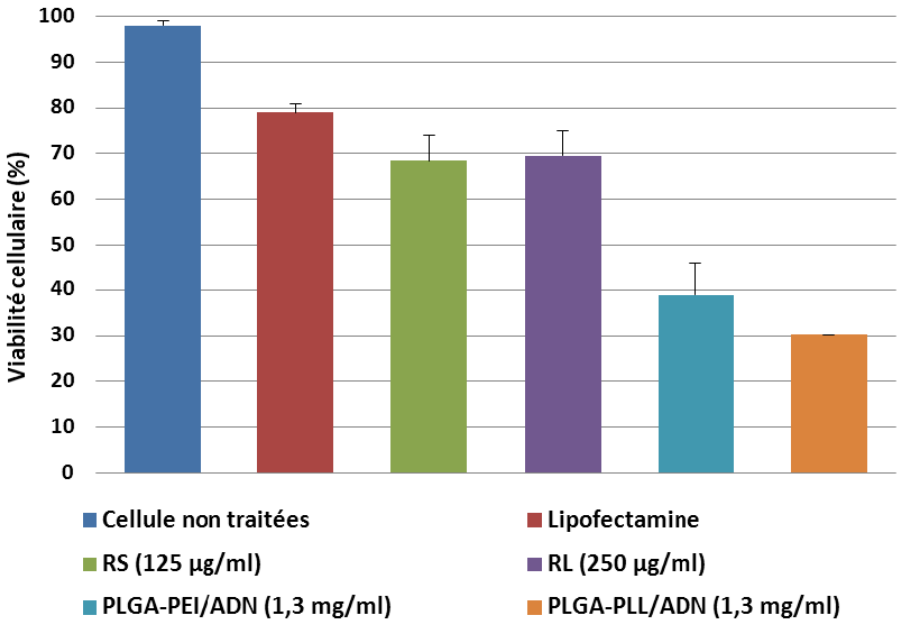


Figure 28 : Etude de la cytotoxicité par test MTT des vecteurs formulés par double émulsion-évaporation de solvant sur les cellules FaDu et donnant les taux de transfection les plus élevées. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité (moyenne ± écart-type ; n=9)

Ainsi, les particules de PLGA–PLL/ADN aboutissant à 30% de transfection entrainent une mortalité cellulaire élevée (70%).

En résumé, les quantités de particules-vecteurs d'ADN utilisables au contact des cellules FaDu varient, en fonction de la nature du polymère et de sa concentration :

- Les Eudragit® sont plus cytotoxiques que le PLGA, sans doute en raison des charges positives des Eudragit® qui entraînent plus de dommages aux membranes (effets tensioactifs) qu'avec le PLGA, polymère faiblement chargé [206]. De plus, dans notre étude, les complexes PEI/ADN présentent la même cytotoxicité que les complexes PLL/ADN. Ceci est en adéquation avec ce que Wang et coll. avaient observé en décrivant la PLL comme ayant une toxicité similaire à la PEI [207].

- La concentration en polymère peut également avoir une influence sur la cytotoxicité et la transfection, comme nous l'avons également évoqué précédemment. Pour les Eudragit® étudiés, nous avons vu que, plus la concentration en nanoparticules augmente, plus la toxicité devient importante (pour des concentrations en particules de 250 à 500 mg/mL). Ceci ne nous permettait pas d'envisager des études de transfection avec des concentrations supérieures à 500 mg/mL de particules. Les résultats de cytotoxicité présentés dans la *figure 29* sous forme d'histogrammes représentent la viabilité cellulaire (%) obtenue avec les formulations de PLGA associées aux complexes PLL/ADN (N/P= 20).

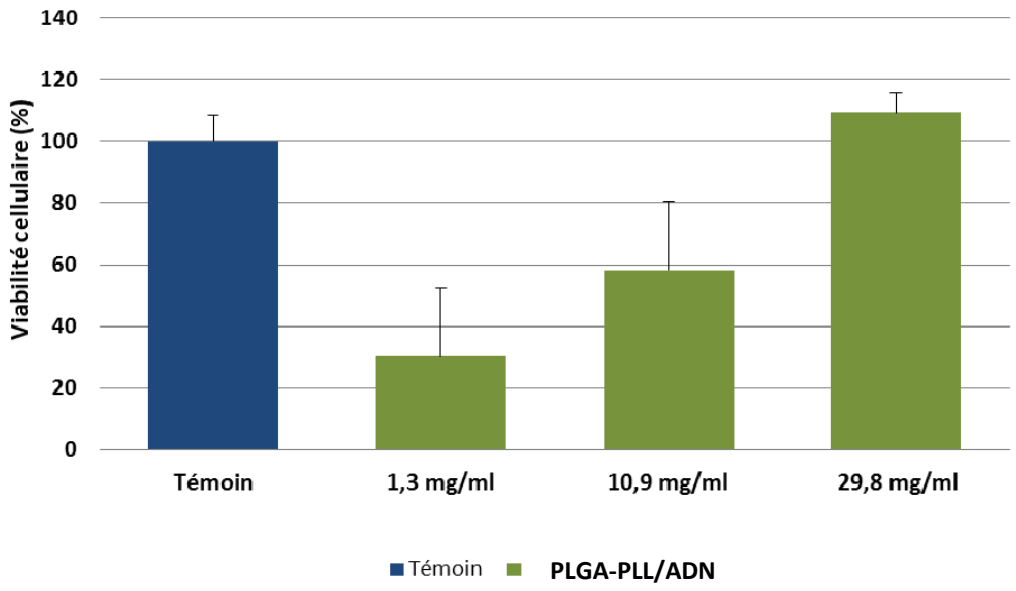


Figure 29 : Viabilité des cellules FaDu en pourcentage, après 24h de mise en contact avec les nanoparticules de PLGA-PLL/ADN (moyenne ± écart-type ; n=9).

Les nanoparticules de PLGA-PLL/ADN donnent des résultats surprenants, puisque leur toxicité diminue lorsque leur concentration augmente. Des résultats similaires ont été obtenus pour les nanoparticules de PLGA-PEI/ADN. Nous avons observé une interférence des nanoparticules de PLGA seules, sans cellules, avec le test MTT. Même après prise en compte de cet effet matrice, cette tendance reste la même. C'est également pour cette raison que nous avons sélectionné la concentration en particules de 1,3 mg/mL pour la suite des études.

➢ Nos résultats de transfection et de cytotoxicité varient en fonction du procédé de formulation. Les nanoparticules préparées par double émulsion – évaporation de solvant entrainent une plus faible mortalité cellulaire par rapport aux nanoparticules préparées par nanoprécipitation, ce qui est également évoqué dans la littérature [208]. De plus, les particules de PLGA/PEI sur lesquelles l'ADN est adsorbé se caractérisent par une transfection et une cytotoxicité moins importantes que les particules de PLGA sur lesquelles des complexes

PEI/ADN sont adsorbés, pour une même concentration en particules. Les nanoparticules de PLGA/PEI ont montré une toxicité d'environ 60% et une efficacité de transfection de seulement 3% (pour une concentration en particules de 1,3 mg/mL). D'autres études ont montré une toxicité moins importante (environ entre 40 et 20%) mais le type de PEI n'était pas le même, et la taille des nanoparticules différait également [118, 135, 191]. En revanche, cette très faible efficacité de transfection est en corrélation avec les résultats retrouvés dans de nombreuses études [118, 135, 194, 209]. Takashima et coll. (2007), a montré que des nanoparticules de PLGA/PEI d'environ 340 nm et des microparticules de PLGA/PEI d'environ 1µm sont capables de transfecter les cellules de types Cos-7. Par contre, ces particules présentent un faible taux de transfection par rapport à la lipofectamine (environ 3 à 4 fois moins d'expression de la luciférase avec les nanoparticules et les microparticules).

- L'efficacité des vecteurs développés dans cette étude varie aussi en fonction du ratio N/P utilisé. Pour les particules de PLGA–PEI/ADN ou PLGA–PLL/ADN, les résultats de toxicité montrent une toxicité qui augmente pour les complexes PEI/ADN lorsque le rapport N/P s'élève. Ces résultats sont en corrélation avec la littérature [210]. La *figure 30* représente les résultats que nous avons obtenus pour les complexes PLL/ADN et pour les particules de PLGA sur lesquelles les complexes PLL/ADN sont adsorbés. Un taux de transfection de 40% est obtenu pour les complexes PLL/ADN (N/P=20), pour une cytotoxicité de 60%. Or, les résultats rapportés dans la littérature pour les complexes PLL/ADN (N/P=20) décrivent une toxicité d'environ 10% sur les cellules Cos-1 [186]!

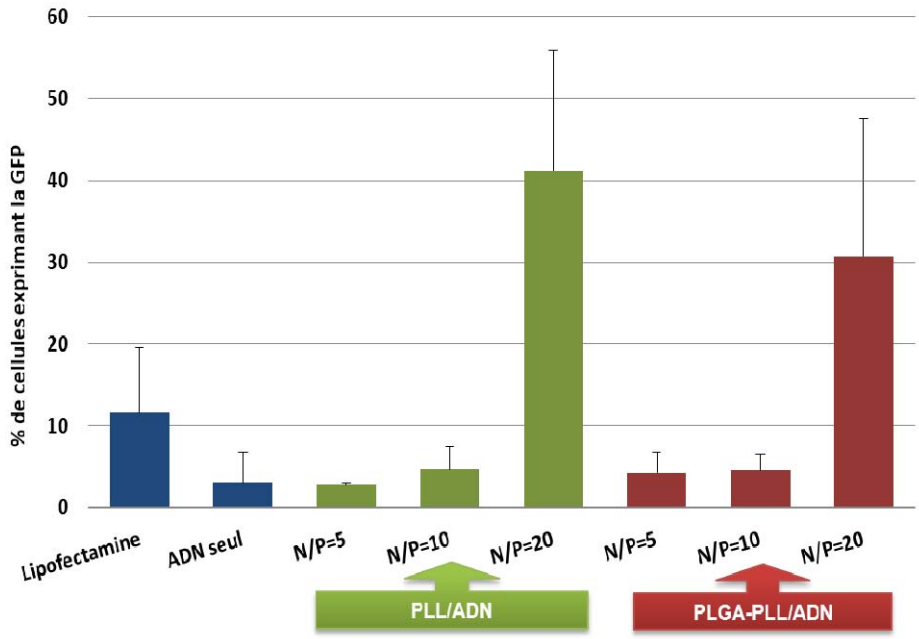


Figure 30 : Pourcentage de transfection des cellules FaDu avec la lipofectamine, l'ADN seul, les complexes PLL/ADN et les nanoparticules de PLGA-PLL/ADN (moyenne ± écart-type ; n=4).

Ainsi, parmi les formulations proposées, celle qui répond le mieux au cahier des charges que nous nous sommes fixés sont les particules de PLGA formulées par double émulsion – évaporation de solvant sur lesquelles les complexes PEI/ADN de ratio N/P égal à 20 sont adsorbés. En effet, un taux de transfection de 60% largement supérieur à celui de la lipofectamine (15%) a été observé (pour une concentration en particules de 1,3 mg/mL), mais avec une toxicité de 60%. Composés de polymères biodégradables, ces vecteurs peuvent prétendre être utilisés facilement dans l'organisme car le procédé de formulation par double émulsion – évaporation de solvant permet d'aboutir à l'obtention de particules de 380nm, taille parfaitement compatible avec la transfection [118].

Cependant ce vecteur PLGA-PEI/ADN ne répond pas tout à fait à tous les critères :

- les taux de transfection obtenus sont équivalents à ceux obtenus avec uniquement les complexes PEI/ADN (N/P=20). L'étude de la cinétique de libération de l'ADN a permis de montrer une libération prématurée du complexe ou de l'ADN au cours des premiers temps (« effet burst » jusqu'à 4h), alors qu'une libération de la totalité de l'ADN n'est pas obtenue au bout des 24h d'étude (*cf. Figure 5 de l'article 2*). Dans ces conditions, l'intérêt des particules de PLGA reste minime et ne permet pas le contrôle de la libération des complexes qu'elle présente en surface.

- Nous avons étudié la protection des complexes contre l'action des DNAses. Les complexes PLL/ADN (N/P=20) et nanoparticules PLGA-PLL/ADN ont été mis en contact pendant 10 min avec les DNAses (1U/µg d'ADN) selon le protocole de Zhu et coll. (2005) [211]. Les résultats montrent que le complexe PLL/ADN protège l'ADN de la dégradation des DNAses. L'utilisation des nanoparticules de PLGA ne modifie pas cette protection : En effet, l'ADN complexé à la PLL est déjà protégé. Aucune dégradation de l'ADN n'est observée, lorsque ces complexes PLL-ADN sont absorbés sur les nanoparticules de PLGA (*Figure 31*).

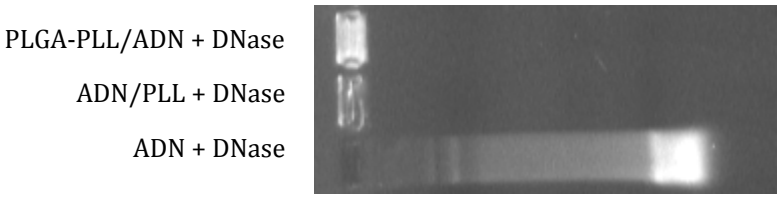


Figure 31 : Migration sur gel d'agarose (0,8%(m/v) ; 90 V/cm) des complexes PLL/ADN et des nanoparticules de PLGA-PLL/ADN après traitement à la Dnase. La présence d'une traînée témoigne de la dégradation de l'ADN lors du procédé de formulation.

Ainsi, l'apport des particules de PLGA ne réside que dans deux aspects :

- la libération des complexes peut être étendue sur plusieurs jours.

- une stabilité plus importante. Ce qui est conforme à la littérature où il est rapporté que les complexes PEI/ADN présentent une demi-vie plasmatique plus courte que lors d'une adsorption sur des particules de PLGA [212].

2 OPTIMISATIONS POSSIBLES ET PERSPECTIVES

2.1 OPTIMISATION DE LA FORMULATION

Une optimisation du vecteur demeure donc nécessaire, et différentes stratégies pour améliorer l'internalisation des vecteurs peuvent être envisagées :

- Le polyéthylène glycol (PEG) peut être utilisé dans la formulation avec le PLGA. Il est connu pour diminuer la toxicité des vecteurs, pour stabiliser les complexes en les rendant plus hydrosolubles, et permet une expression plus durable du transgène [213].

- Le greffage d'un motif ou d'une séquence peptidique sur les nanoparticules pourrait permettre de mieux cibler l'enveloppe nucléaire, et d'aboutir à un passage plus actif dans le noyau [214-216] comme les facteurs de transcription qui portent dans leur séquence peptidique, une séquence spécifique de localisation nucléaire (NLS). Cette séquence permet l'interaction avec l'importine α et le déclenchement de la translocation nucléaire par des mécanismes actifs à travers les complexes du pore nucléaire [214].

- L'utilisation de ligands spécifiques greffés sur les nanoparticules peut également cibler le récepteur de la membrane plasmique, et améliorer l'endocytose. Les ligands pouvant être utilisés sont la transferrine, des groupements galactose, des groupements mannose, des anticorps, et des peptides [86, 217-220].

- L'utilisation de la méthode de nanoprecipitation pour obtenir des nanoparticules inférieures à 100 nm, décrites dans la littérature comme étant mieux internalisées serait également une stratégie envisageable.

2.2 AMÉLIORER LE PASSAGE DES MEMBRANES

L'efficacité modérée en transfection des vecteurs développés peut être également causée par une faible internalisation du vecteur ou des complexes véhiculant l'ADN. Afin de permettre un passage plus aisé des membranes cellulaires, nous avons associé la PCI aux vecteurs développés. En effet, l'internalisation cellulaire des vecteurs de transfection se fait généralement par endocytose. Les vecteurs sont alors localisés dans les endosomes où ils peuvent être dégradés dans les lysosomes avant d'atteindre le noyau. L'efficacité de transfert dépend alors de leur libération des endosomes/lysosomes pour atteindre le cytosol et le noyau. Dans ce contexte une nouvelle approche de l'internalisation photochimique, a été développée dans le but d'augmenter l'efficacité de transfert des gènes par déstabilisation de la membrane des endosomes [163, 164]. Cette technique à l'avantage de ne pas être limitée par la taille des agents à transfecter (comme par exemple la Bléomycine), et de ne pas être spécifique d'un type de molécules.

Dans la littérature, les premières études utilisant la PCI ont été menées avec des macromolécules ou des complexes tels que les dendrimères, le PEI ou des liposomes [169, 181, 182], et les données bibliographiques montrent que la PCI améliore l'efficacité de transfert des complexes de PEI glycosylé/ADN pour atteindre environ 50%, taux comparable au niveau d'expression obtenu avec des vecteurs viraux [169].

Paradoxalement dans notre étude, l'association de la PCI avec les nanoparticules n'entraine pas d'apport supplémentaire sur l'efficacité de transfert de gènes. Pourtant, une adaptation préalable des conditions de la méthode de PCI a été effectuée sur les cellules FaDu avec les complexes PEI/ADN. La littérature toutefois, rapporte de nombreux paramètres susceptibles d'intervenir dans l'efficacité de transfert de gènes avec la méthode de PCI, parmi lesquels peuvent être cités :

- le type de molécules à transfecter (*cf. Chapitre 5.1, tableau 6)*
- la nature du photosensibilisant : le $TPPS_{2a}$ est un photosensibilisant couramment utilisé dans la PCI, cependant lors de l'irradiation le $TPPS_{2a}$ est connu pour son effet cytotoxique. Dans une étude menée par Nishiyama et coll. (2005), les effets cytotoxiques de ce photosensibilisant ont été limités par l'utilisation d'un dendrimère phtalocyanine [221]
- le type cellulaire utilisé : ceci est dû au niveau d'expression des récepteurs des cellules cibles (*cf. Chapitre 5.3.3, tableau 7*).

D'autres techniques physiques peuvent être couplées pour améliorer le transfert de gènes avec les nanoparticules de polymère tel que l'électroporation, l'irradiation laser, l'électrotransfert, etc….. Ces techniques physiques présentées dans le chapitre 4.1 de la revue bibliographique permettent selon différents modes d'action d'améliorer l'internalisation des oligonucléotides. [222]parfois très coûteux.

A ce jour, l'objectif principal de la thérapie génique est le développement de vecteurs pouvant encapsuler et délivrer un gène au niveau de cellules cibles pour l'expression de la protéine correspondante. Par ailleurs, la transfection d'ARN interférant (siRNA) afin d'éteindre

l'expression d'une protéine peut être intéressante à étudier. Ces siRNA agissent au niveau post-transcriptionnel, en catalysant la dégradation des ARN messagers. A l'inverse de l'ADN qui doit entrer dans le noyau, ces acides nucléiques agissent au niveau du cytoplasme, seules les membranes plasmiques et endo-lysosomales sont donc à franchir ; le passage de l'enveloppe nucléaire et la transcription sont évités. Pour apporter dans la cellule des siRNA et permettre leur action efficace, des vecteurs polymériques [71, 223-225] ou lipidiques [222, 226] ont été formulés : il s'agit par exemple de lipoplexes [222, 226] ou de nanoparticules de silice recouvertes de PEI [225]. Certains de ces vecteurs se sont montrés efficaces pour l'internalisation de siRNA mais également pour le transfert d'ADN. Cette efficacité dépend principalement du lipide ou du polymère utilisé (masse moléculaire, nature du lipide…). Même si ces particules engendrent parfois une cytotoxicité importante (jusqu'à 20% de viabilité cellulaire), les résultats d'extinction de l'expression de la protéine suivie atteignent 60 à 80% en fonction du vecteur utilisé [222, 225]. Des nanoparticules de PLGA/PEI, formulées selon un protocole similaire à celui que nous avons utilisé, ont été également décrites récemment dans la littérature pour véhiculer des siRNA. Ces nanoparticules présentent une faible cytotoxicité (moins de 10%), et induisent une extinction de l'expression de la luciférase d'environ 70% [195, 227]. Enfin, lors d'une communication, Epple M. et coll. a montré que la transfection d'ADN à l'aide de nanoparticules de phosphate de calcium aboutissait à un niveau d'expression de la GFP faible (10%) et proche de celui constaté dans notre étude avec les particules d'Eudragit®. En revanche, ces nanoparticules utilisées pour le transfert de siRNA ont permis un niveau d'extinction de la GFP de 48%. (« Functionalized Calcium Phosphate Nanoparticles : Tools for Gene Delivery and Imaging » présentée au congrés Nano SMH à Pont-à-mousson le 21 juin 2010). C'est dans cette optique que nous pourrions envisager l'utilisation des particules décrites dans ce projet de thèse, peu efficaces pour vectoriser l'ADN, pour véhiculer des siRNA.

3 CONCLUSION

Le développement de vecteurs non viraux adaptés au transfert de gène suscite actuellement un grand intérêt dans le domaine pharmaceutique, comme en témoigne les nombreuses études publiées ces dernières années qui présentent des liposomes ou des particules de polymères pour véhiculer de l'ADN [183, 191, 202]. Les principaux vecteurs ont été exposés dans la première partie bibliographique de ce travail. Ces vecteurs non viraux apportent donc des perspectives encourageantes pour traiter les cancers ou des maladies génétiques et permettent notamment de supplanter aux problèmes d'immunogénicité ou de production couteuse des vecteurs viraux. Les recherches dans le domaine de la galénique permettent donc d'envisager un vecteur stable, adaptable à chaque « gène-médicament », à chaque patient et directement utilisable au chevet du patient.

C'est dans cet esprit que s'inscrivent les études expérimentales exposées dans ce manuscrit en proposant de développer plusieurs « outil-vecteur d'ADN » à base de polymères polycationiques. Ce projet s'est donc articulé sur deux axes majeurs :

- la formulation et la caractérisation physico-chimiques des particules.
- l'évaluation de la cytotoxicité et de l'efficacité de transfection des vecteurs développés.

Dans un premier temps, nous avons préparés des vecteurs polymériques à base de polymères méthacryliques (Eudragit RS et RL) ou d'une combinaison de PLGA et de PEI ou PLL. Deux méthodes de formulation ont été utilisées : la nanoprécipitation et la méthode de double émulsion / évaporation de solvant. Devant la difficulté à encapsuler le plasmide sélectionné, nous nous sommes proposés d'adsorber l'ADN, seul ou sous la forme de complexes, en surface des particules. Une caractérisation physicochimique poussée de ces nanoparticules a été réalisée. Il s'agissait par exemple de suivre la taille, le potentiel zêta et le taux d'adsorption de l'ADN des particules afin d'étudier les interactions polymères / ADN et de déterminer les

quantités respectives à mettre en contact pour permettre une adsorption optimale des 4µg d'ADN nécessaires à la transfection.

Dans une seconde partie, la cytotoxicité des particules a été évaluée en parallèle de l'efficacité de transfection. Pour ce faire, différentes lignées ont été utilisées. Nos résultats ont montré que la cytotoxicité des vecteurs proposés est variable en fonction :

- du type cellulaire : bien que les cellules MDA-MB 231 étaient moins sensibles aux nanoparticules au regard des résultats du test de cytotoxicité, les taux de transfection les plus élevés ont été constatés sur les cellules FaDu.
- du procédé de formulation : les nanoparticules d'Eudragit® préparées par double émulsion-évaporation de solvant entrainent une plus faible mortalité cellulaire que les nanoparticules préparées par nanoprécipitation.

Ainsi, les niveaux d'expression de la GFP, protéine codée par le plasmide véhiculé dans nos études, atteignaient 3 à 80 % selon les particules utilisées. La plus forte expression a été observée dans le cas des nanoparticules de PLGA sur lesquelles les complexes PEI/ADN étaient adsorbés. Par les études complémentaires réalisées (cinétique de désorption, test des DNases…) et les résultats obtenus avec les complexes PEI/ADN, nous avons supposé que la particule protégeait et véhiculait l'ADN et que l'efficacité de transfection obtenue était liée principalement au complexe PEI/ADN.

Afin d'améliorer l'efficacité de transfection des vecteurs développés, nous les avons associés à la technique d'internalisation photochimique, technique facilitant l'échappement de l'endosome des molécules d'intérêt, par l'utilisation d'un photosensibilisant déstabilisant les

membranes lors d'une exposition à la lumière. L'ADN pourrait alors être plus vite disponible au niveau du cytoplasme et du noyau. Malgré une adaptation du protocole de PCI sur les cellules FaDu, les niveaux d'expression de la GFP constatés lors de cette association étaient très faibles. La cytotoxicité des vecteurs élaborés, associée à celle inhérente à la technique de PCI, nous parait être responsable ces résultats.

En conclusion, s'il a été possible de formuler plusieurs vecteurs-ADN, l'efficacité de transfection n'a pas atteint les résultats escomptés. Nous nous sommes heurtés en effet au problème majeur de cytotoxicité liée à l'internalisation des vecteurs dans la cellule et aux dommages secondaires qu'elle engendre. Le juste équilibre cytotoxicité/efficacité de transfection n'est pas simple à déterminer et varie pour chaque vecteur élaboré. Les vecteurs décrits ouvrent cependant des perspectives pour, par exemple, véhiculer des siRNA. Ces acides nucléiques n'ont pas à franchir la membrane nucléaire et agissent au niveau cytoplasmique. Des optimisations des vecteurs proposés sont toutefois encore nécessaires afin, par exemple, de limiter en aval les dommages liés à leur internalisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Friedmann, T., *Progress toward human gene therapy.* Science, 1989. **244**(4910): p. 1275-81.
2. Kren, B.T. and Steer, C.J., *The application of DNA repair vectors to gene therapy.* Curr Opin Biotechnol, 2002. **13**(5): p. 473-81.
3. Goto, T., Nishi, T., Kobayashi, O., Tamura, T., Dev, S.B., Takeshima, H., Kochi, M., Kuratsu, J., Sakata, T., and Ushio, Y., *Combination electro-gene therapy using herpes virus thymidine kinase and interleukin-12 expression plasmids is highly efficient against murine carcinomas in vivo.* Mol Ther, 2004. **10**(5): p. 929-37.
4. Noel, D., Pelegrin, M., Kramer, S., Jacquet, C., Skander, N., and Piechaczyk, M., *High in vivo production of a model monoclonal antibody on adenoviral gene transfer.* Hum Gene Ther, 2002. **13**(12): p. 1483-93.
5. Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P.L., *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo.* Science, 1990. **247**(4949 Pt 1): p. 1465-8.
6. Braun, S., *Muscular gene transfer using nonviral vectors.* Curr Gene Ther, 2008. **8**(5): p. 391-405.
7. Hengge, U.R., Chan, E.F., Foster, R.A., Walker, P.S., and Vogel, J.C., *Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA.* Nat Genet, 1995. **10**(2): p. 161-6.
8. Yovandich, J., O'Malley, B., Jr., Sikes, M., and Ledley, F.D., *Gene transfer to synovial cells by intra-articular administration of plasmid DNA.* Hum Gene Ther, 1995. **6**(5): p. 603-10.
9. Li, K., Welikson, R.E., Vikstrom, K.L., and Leinwand, L.A., *Direct gene transfer into the mouse heart.* J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(5): p. 1499-504.
10. Schwartz, B., Benoist, C., Abdallah, B., Rangara, R., Hassan, A., Scherman, D., and Demeneix, B.A., *Gene transfer by naked DNA into adult mouse brain.* Gene Ther, 1996. **3**(5): p. 405-11.
11. Sikes, M.L., O'Malley, B.W., Jr., Finegold, M.J., and Ledley, F.D., *In vivo gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection.* Hum Gene Ther, 1994. **5**(7): p. 837-44.

12. Hickman, M.A., Malone, R.W., Lehmann-Bruinsma, K., Sih, T.R., Knoell, D., Szoka, F.C., Walzem, R., Carlson, D.M., and Powell, J.S., *Gene expression following direct injection of DNA into liver.* Hum Gene Ther, 1994. **5**(12): p. 1477-83.
13. Krieg, A.M., *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 709-60.
14. Cui, Z., *DNA vaccine.* Adv Genet, 2005. **54**: p. 257-89.
15. Pilla, L., Valenti, R., Marrari, A., Patuzzo, R., Santinami, M., Parmiani, G., and Rivoltini, L., *Vaccination: role in metastatic melanoma.* Expert Rev Anticancer Ther, 2006. **6**(8): p. 1305-18.
16. Victora, G.D., Socorro-Silva, A., Volsi, E.C., Abdallah, K., Lima, F.D., Smith, R.B., Moyses, R.A., Zarate-Blades, C.R., Michaluart, P., Silva, C.L., Kalil, J., and Coelho, V., *Immune response to vaccination with DNA-Hsp65 in a phase I clinical trial with head and neck cancer patients.* Cancer Gene Ther, 2009. **16**(7): p. 598-608.
17. Ersching, J. and Pinto, A.R., *HIV-1 vaccine clinical trials: the Brazilian experience.* Rev Med Virol, 2009. **19**(5): p. 301-11.
18. Pokorna, D., Rubio, I., and Muller, M., *DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants.* Genet Vaccines Ther, 2008. **6**: p. 4.
19. Lundstrom, K., *Latest development in viral vectors for gene therapy.* Trends Biotechnol, 2003. **21**(3): p. 117-22.
20. Robbins, P.D. and Ghivizzani, S.C., *Viral vectors for gene therapy.* Pharmacol Ther, 1998. **80**(1): p. 35-47.
21. Kay, M.A., Glorioso, J.C., and Naldini, L., *Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics.* Nat Med, 2001. **7**(1): p. 33-40.
22. Amado, R.G. and Chen, I.S., *Lentiviral vectors--the promise of gene therapy within reach?* Science, 1999. **285**(5428): p. 674-6.
23. Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.* Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
24. Goldman, M.J., Lee, P.S., Yang, J.S., and Wilson, J.M., *Lentiviral vectors for gene therapy of cystic fibrosis.* Hum Gene Ther, 1997. **8**(18): p. 2261-8.
25. Kalpana, G.V., *Retroviral vectors for liver-directed gene therapy.* Semin Liver Dis, 1999. **19**(1): p. 27-37.

26. Zhang, X. and Godbey, W.T., *Viral vectors for gene delivery in tissue engineering.* Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(4): p. 515-34.
27. Douglas, J.T., *Adenoviral vectors for gene therapy.* Mol Biotechnol, 2007. **36**(1): p. 71-80.
28. Alba, R., Bosch, A., and Chillon, M., *Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy.* Gene Ther, 2005. **12 Suppl 1**: p. S18-27.
29. Yang, Z.R., Wang, H.F., Zhao, J., Peng, Y.Y., Wang, J., Guinn, B.A., and Huang, L.Q., *Recent developments in the use of adenoviruses and immunotoxins in cancer gene therapy.* Cancer Gene Ther, 2007. **14**(7): p. 599-615.
30. Marconi, P., Argnani, R., Epstein, A.L., and Manservigi, R., *HSV as a Vector in Vaccine Development and Gene Therapy.* Adv Exp Med Biol, 2009. **655**: p. 118-44.
31. de Silva, S. and Bowers, W.J., *Herpes Virus Amplicon Vectors.* Viruses, 2009. **1**(3): p. 594-629.
32. Mislick, K.A. and Baldeschwieler, J.D., *Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12349-54.
33. Vasir, J.K. and Labhasetwar, V., *Polymeric nanoparticles for gene delivery.* Expert Opin Drug Deliv, 2006. **3**(3): p. 325-44.
34. Yang, X., *Nano- and microparticle-based imaging of cardiovascular interventions: overview.* Radiology, 2007. **243**(2): p. 340-7.
35. Chesnoy, S. and Huang, L., *Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery.* Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000. **29**: p. 27-47.
36. Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7413-7.
37. Stamatatos, L., Leventis, R., Zuckermann, M.J., and Silvius, J.R., *Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes.* Biochemistry, 1988. **27**(11): p. 3917-25.
38. Xia, H., Mao, Q., Paulson, H.L., and Davidson, B.L., *siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo.* Nat Biotechnol, 2002. **20**(10): p. 1006-10.
39. Hung, C.F., Hwang, T.L., Chang, C.C., and Fang, J.Y., *Physicochemical characterization and gene transfection efficiency of lipid emulsions with various co-emulsifiers.* Int J Pharm, 2005. **289**(1-2): p. 197-208.

40. Matsuura, M., Yamazaki, Y., Sugiyama, M., Kondo, M., Ori, H., Nango, M., and Oku, N., *Polycation liposome-mediated gene transfer in vivo.* Biochim Biophys Acta, 2003. **1612**(2): p. 136-43.
41. Lipowsky, R., *The morphology of lipid membranes.* Curr Opin Struct Biol, 1995. **5**(4): p. 531-40.
42. Lipowsky, R., Sackmann E.,, *Structure and dynamics of membranes*. Elsevier Sci. B.V. Vol. 1B. 1995.
43. Bangham, A.D., Standish, M.M., and Watkins, J.C., *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids.* J Mol Biol, 1965. **13**(1): p. 238-52.
44. Alino, S.F., *Long-term expression of the human alpha1-antitrypsin gene in mice employing anionic and cationic liposome vector.* Biochem Pharmacol, 1997. **54**(1): p. 9-13.
45. Edelstein, M.L., Abedi, M.R., and Wixon, J., *Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update.* J Gene Med, 2007. **9**(10): p. 833-42.
46. Gopalan, B., Ito, I., Branch, C.D., Stephens, C., Roth, J.A., and Ramesh, R., *Nanoparticle based systemic gene therapy for lung cancer: molecular mechanisms and strategies to suppress nanoparticle-mediated inflammatory response.* Technol Cancer Res Treat, 2004. **3**(6): p. 647-57.
47. Nabel, G.J., Yang, Z.Y., Nabel, E.G., Bishop, K., Marquet, M., Felgner, P.L., Gordon, D., and Chang, A.E., *Direct gene transfer for treatment of human cancer.* Ann N Y Acad Sci, 1995. **772**: p. 227-31.
48. Rainov, N.G. and Ren, H., *Gene therapy for human malignant brain tumors.* Cancer J, 2003. **9**(3): p. 180-8.
49. Gill, D.R., Southern, K.W., Mofford, K.A., Seddon, T., Huang, L., Sorgi, F., Thomson, A., MacVinish, L.J., Ratcliff, R., Bilton, D., Lane, D.J., Littlewood, J.M., Webb, A.K., Middleton, P.G., Colledge, W.H., Cuthbert, A.W., Evans, M.J., Higgins, C.F., and Hyde, S.C., *A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis.* Gene Ther, 1997. **4**(3): p. 199-209.
50. Caplen, N.J., Alton, E.W., Middleton, P.G., Dorin, J.R., Stevenson, B.J., Gao, X., Durham, S.R., Jeffery, P.K., Hodson, M.E., Coutelle, C., and et al., *Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis.* Nat Med, 1995. **1**(1): p. 39-46.

51. Brigham, K.L., Lane, K.B., Meyrick, B., Stecenko, A.A., Strack, S., Cannon, D.R., Caudill, M., and Canonico, A.E., *Transfection of nasal mucosa with a normal alpha1-antitrypsin gene in alpha1-antitrypsin-deficient subjects: comparison with protein therapy.* Hum Gene Ther, 2000. **11**(7): p. 1023-32.

52. Ge, Q., Filip, L., Bai, A., Nguyen, T., Eisen, H.N., and Chen, J., *Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8676-81.

53. Hui, S.W., Langner, M., Zhao, Y.L., Ross, P., Hurley, E., and Chan, K., *The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer.* Biophys J, 1996. **71**(2): p. 590-9.

54. Hong, K., Zheng, W., Baker, A., and Papahadjopoulos, D., *Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery.* FEBS Lett, 1997. **400**(2): p. 233-7.

55. Borchard, G., *Chitosans for gene delivery.* Adv Drug Deliv Rev, 2001. **52**(2): p. 145-50.

56. Lee, K.Y., Kwon, I.C., Kim, Y.H., Jo, W.H., and Jeong, S.Y., *Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system.* J Control Release, 1998. **51**(2-3): p. 213-20.

57. Janes, K.A., Calvo, P., and Alonso, M.J., *Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules.* Adv Drug Deliv Rev, 2001. **47**(1): p. 83-97.

58. Guang Liu, W. and De Yao, K., *Chitosan and its derivatives--a promising non-viral vector for gene transfection.* J Control Release, 2002. **83**(1): p. 1-11.

59. Jarver, P., Langel, K., El-Andaloussi, S., and Langel, U., *Applications of cell-penetrating peptides in regulation of gene expression.* Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 4): p. 770-4.

60. Kilk, K., El-Andaloussi, S., Jarver, P., Meikas, A., Valkna, A., Bartfai, T., Kogerman, P., Metsis, M., and Langel, U., *Evaluation of transportan 10 in PEI mediated plasmid delivery assay.* J Control Release, 2005. **103**(2): p. 511-23.

61. Rittner, K., Benavente, A., Bompard-Sorlet, A., Heitz, F., Divita, G., Brasseur, R., and Jacobs, E., *New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo.* Mol Ther, 2002. **5**(2): p. 104-14.

62. Tung, C.H., Mueller, S., and Weissleder, R., *Novel branching membrane translocational peptide as gene delivery vector.* Bioorg Med Chem, 2002. **10**(11): p. 3609-14.

63. Liu, Z., Li, M., Cui, D., and Fei, J., *Macro-branched cell-penetrating peptide design for gene delivery.* J Control Release, 2005. **102**(3): p. 699-710.

64. Wu, G.Y. and Wu, C.H., *Evidence for targeted gene delivery to Hep G2 hepatoma cells in vitro.* Biochemistry, 1988. **27**(3): p. 887-92.

65. Symonds, P., Murray, J.C., Hunter, A.C., Debska, G., Szewczyk, A., and Moghimi, S.M., *Low and high molecular weight poly(L-lysine)s/poly(L-lysine)-DNA complexes initiate mitochondrial-mediated apoptosis differently.* FEBS Lett, 2005. **579**(27): p. 6191-8.

66. Wolfert, M.A. and Seymour, L.W., *Chloroquine and amphipathic peptide helices show synergistic transfection in vitro.* Gene Ther, 1998. **5**(3): p. 409-14.

67. Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., and Birnstiel, M.L., *Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(17): p. 7934-8.

68. Harris, J.M., *Poly(ethylene glycol) chemistry : biotechnical and biomedical applications* in *biotechnical and biomedical applications* 1992 Plenum Press New York.

69. Boussif, O., Delair, T., Brua, C., Veron, L., Pavirani, A., and Kolbe, H.V., *Synthesis of polyallylamine derivatives and their use as gene transfer vectors in vitro.* Bioconjug Chem, 1999. **10**(5): p. 877-83.

70. Pichon, C., Goncalves, C., and Midoux, P., *Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery.* Adv Drug Deliv Rev, 2001. **53**(1): p. 75-94.

71. Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J.J., and Jaffres, P.A., *Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers.* Br J Pharmacol, 2009. **157**(2): p. 166-78.

72. Saccardo, P., Villaverde, A., and Gonzalez-Montalban, N., *Peptide-mediated DNA condensation for non-viral gene therapy.* Biotechnol Adv, 2009. **27**(4): p. 432-8.

73. Ferrari, S., Moro, E., Pettenazzo, A., Behr, J.P., Zacchello, F., and Scarpa, M., *ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo.* Gene Ther, 1997. **4**(10): p. 1100-6.

74. Boletta, A., Benigni, A., Lutz, J., Remuzzi, G., Soria, M.R., and Monaco, L., *Nonviral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine.* Hum Gene Ther, 1997. **8**(10): p. 1243-51.

75. Godbey, W.T., Wu, K.K., and Mikos, A.G., *Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle.* J Biomed Mater Res, 1999. **45**(3): p. 268-75.

76. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7297-301.

77. Bouali, S., Chretien, A.S., Ramacci, C., Rouyer, M., Becuwe, P., and Merlin, J.L., *PTEN expression controls cellular response to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK downstream signaling in KRAS wild-type, hormone refractory prostate cancer cells.* Oncol Rep, 2009. **21**(3): p. 731-5.

78. Bouali, S., Chretien, A.S., Ramacci, C., Rouyer, M., Marchal, S., Galenne, T., Juin, P., Becuwe, P., and Merlin, J.L., *P53 and PTEN expression contribute to the inhibition of EGFR downstream signaling pathway by cetuximab.* Cancer Gene Ther, 2009. **16**(6): p. 498-507.

79. Kunath, K., von Harpe, A., Fischer, D., Petersen, H., Bickel, U., Voigt, K., and Kissel, T., *Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine.* J Control Release, 2003. **89**(1): p. 113-25.

80. Dunlap, D.D., Maggi, A., Soria, M.R., and Monaco, L., *Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery.* Nucleic Acids Res, 1997. **25**(15): p. 3095-101.

81. Choosakoonkriang, S., Wiethoff, C.M., Koe, G.S., Koe, J.G., Anchordoquy, T.J., and Middaugh, C.R., *An infrared spectroscopic study of the effect of hydration on cationic lipid/DNA complexes.* J Pharm Sci, 2003. **92**(1): p. 115-30.

82. Clamme, J.P., Azoulay, J., and Mely, Y., *Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy.* Biophys J, 2003. **84**(3): p. 1960-8.

83. Boeckle, S., von Gersdorff, K., van der Piepen, S., Culmsee, C., Wagner, E., and Ogris, M., *Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer.* J Gene Med, 2004. **6**(10): p. 1102-11.

84. Ogris, M., Steinlein, P., Kursa, M., Mechtler, K., Kircheis, R., and Wagner, E., *The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells.* Gene Ther, 1998. **5**(10): p. 1425-33.

85. Bettinger, T., Remy, J.S., and Erbacher, P., *Size reduction of galactosylated PEI/DNA complexes improves lectin-mediated gene transfer into hepatocytes.* Bioconjug Chem, 1999. **10**(4): p. 558-61.

86. Chiu, S.J., Ueno, N.T., and Lee, R.J., *Tumor-targeted gene delivery via anti-HER2 antibody (trastuzumab, Herceptin) conjugated polyethylenimine.* J Control Release, 2004. **97**(2): p. 357-69.

87. Prasmickaite, L., Hogset, A., and Berg, K., *Evaluation of different photosensitizers for use in photochemical gene transfection.* Photochem Photobiol, 2001. **73**(4): p. 388-95.

88. Goula, D., Remy, J.S., Erbacher, P., Wasowicz, M., Levi, G., Abdallah, B., and Demeneix, B.A., *Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system.* Gene Ther, 1998. **5**(5): p. 712-7.

89. Erbacher, P., Bettinger, T., Belguise-Valladier, P., Zou, S., Coll, J.L., Behr, J.P., and Remy, J.S., *Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI).* J Gene Med, 1999. **1**(3): p. 210-22.

90. Goula, D., Benoist, C., Mantero, S., Merlo, G., Levi, G., and Demeneix, B.A., *Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung.* Gene Ther, 1998. **5**(9): p. 1291-5.

91. Wang, D.A., Narang, A.S., Kotb, M., Gaber, A.O., Miller, D.D., Kim, S.W., and Mahato, R.I., *Novel branched poly(ethylenimine)-cholesterol water-soluble lipopolymers for gene delivery.* Biomacromolecules, 2002. **3**(6): p. 1197-207.

92. Merlin, J.L., Dolivet, G., Dubessy, C., Festor, E., Parache, R.M., Verneuil, L., Erbacher, P., Behr, J.P., and Guillemin, F., *Improvement of nonviral p53 gene transfer in human carcinoma cells using glucosylated polyethylenimine derivatives.* Cancer Gene Ther, 2001. **8**(3): p. 203-10.

93. Ndoye, A., Dolivet, G., Hogset, A., Leroux, A., Fifre, A., Erbacher, P., Berg, K., Behr, J.P., Guillemin, F., and Merlin, J.L., *Eradication of p53-mutated head and neck squamous cell carcinoma xenografts using nonviral p53 gene therapy and photochemical internalization.* Mol Ther, 2006. **13**(6): p. 1156-62.

94. Li, J. and Loh, X.J., *Cyclodextrin-based supramolecular architectures: Syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**(9): p. 1000-1017.

95. Uekama, K., Hirayama, F., and Irie, T., *Cyclodextrin Drug Carrier Systems.* Chem Rev, 1998. **98**(5): p. 2045-2076.

96. Zhao, Q., Temsamani, J., and Agrawal, S., *Use of cyclodextrin and its derivatives as carriers for oligonucleotide delivery.* Antisense Res Dev, 1995. **5**(3): p. 185-92.

97. Freeman, D.J. and Niven, R.W., *The influence of sodium glycocholate and other additives on the in vivo transfection of plasmid DNA in the lungs.* Pharm Res, 1996. **13**(2): p. 202-9.

98. Cryan, S.A., Holohan, A., Donohue, R., Darcy, R., and O'Driscoll, C.M., *Cell transfection with polycationic cyclodextrin vectors.* Eur J Pharm Sci, 2004. **21**(5): p. 625-33.

99. Wada, K., Arima, H., Tsutsumi, T., Chihara, Y., Hattori, K., Hirayama, F., and Uekama, K., *Improvement of gene delivery mediated by mannosylated dendrimer/alpha-cyclodextrin conjugates.* J Control Release, 2005. **104**(2): p. 397-413.

100. Wada, K., Arima, H., Tsutsumi, T., Hirayama, F., and Uekama, K., *Enhancing effects of galactosylated dendrimer/alpha-cyclodextrin conjugates on gene transfer efficiency.* Biol Pharm Bull, 2005. **28**(3): p. 500-5.

101. Huang, H., Yu, H., Tang, G., Wang, Q., and Li, J., *Low molecular weight polyethylenimine cross-linked by 2-hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin coupled to peptide targeting HER2 as a gene delivery vector.* Biomaterials, 2010. **31**(7): p. 1830-8.

102. Diaz-Moscoso, A., Le Gourrierec, L., Gomez-Garcia, M., Benito, J.M., Balbuena, P., Ortega-Caballero, F., Guilloteau, N., Di Giorgio, C., Vierling, P., Defaye, J., Ortiz Mellet, C., and Garcia Fernandez, J.M., *Polycationic amphiphilic cyclodextrins for gene delivery: synthesis and effect of structural modifications on plasmid DNA complex stability, cytotoxicity, and gene expression.* Chemistry, 2009. **15**(46): p. 12871-88.

103. Cloninger, M.J., *Biological applications of dendrimers.* Curr Opin Chem Biol, 2002. **6**(6): p. 742-8.

104. Zinselmeyer, B.H., Mackay, S.P., Schatzlein, A.G., and Uchegbu, I.F., *The lower-generation polypropylenimine dendrimers are effective gene-transfer agents.* Pharm Res, 2002. **19**(7): p. 960-7.

105. Haensler, J. and Szoka, F.C., Jr., *Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture.* Bioconjug Chem, 1993. **4**(5): p. 372-9.

106. Gossl, I., Shu, L., Schluter, A.D., and Rabe, J.P., *Molecular structure of single DNA complexes with positively charged dendronized polymers.* J Am Chem Soc, 2002. **124**(24): p. 6860-5.

107. Tang, M.X., Redemann, C.T., and Szoka, F.C., Jr., *In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers.* Bioconjug Chem, 1996. **7**(6): p. 703-14.

108. Dufes, C., Uchegbu, I.F., and Schatzlein, A.G., *Dendrimers in gene delivery.* Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(15): p. 2177-202.

109. Kukowska-Latallo, J.F., Bielinska, A.U., Johnson, J., Spindler, R., Tomalia, D.A., and Baker, J.R., Jr., *Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4897-902.

110. Kim, T.I., Seo, H.J., Choi, J.S., Jang, H.S., Baek, J.U., Kim, K., and Park, J.S., *PAMAM-PEG-PAMAM: novel triblock copolymer as a biocompatible and efficient gene delivery carrier.* Biomacromolecules, 2004. **5**(6): p. 2487-92.

111. Qi, R., Gao, Y., Tang, Y., He, R.R., Liu, T.L., He, Y., Sun, S., Li, B.Y., Li, Y.B., and Liu, G., *PEG-conjugated PAMAM dendrimers mediate efficient intramuscular gene expression.* AAPS J, 2009. **11**(3): p. 395-405.

112. Turunen, M.P., Hiltunen, M.O., Ruponen, M., Virkamaki, L., Szoka, F.C., Jr., Urtti, A., and Yla-Herttuala, S., *Efficient adventitial gene delivery to rabbit carotid artery with cationic polymer-plasmid complexes.* Gene Ther, 1999. **6**(1): p. 6-11.

113. Rudolph, C., Lausier, J., Naundorf, S., Muller, R.H., and Rosenecker, J., *In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers.* J Gene Med, 2000. **2**(4): p. 269-78.

114. Koppu, S., Oh, Y.J., Edrada-Ebel, R., Blatchford, D.R., Tetley, L., Tate, R.J., and Dufes, C., *Tumor regression after systemic administration of a novel tumor-targeted gene delivery system carrying a therapeutic plasmid DNA.* J Control Release, 2009. **143**(2): p. 215-21.

115. Kneuer, C., Ehrhardt, C., Bakowsky, H., Kumar, M.N., Oberle, V., Lehr, C.M., Hoekstra, D., and Bakowsky, U., *The influence of physicochemical parameters on the efficacy of non-viral DNA transfection complexes: a comparative study.* J Nanosci Nanotechnol, 2006. **6**(9-10): p. 2776-82.

116. Prabha, S., Zhou, W.Z., Panyam, J., and Labhasetwar, V., *Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles.* Int J Pharm, 2002. **244**(1-2): p. 105-15.

117. Ribeiro, S., Hussain, N., and Florence, A.T., *Release of DNA from dendriplexes encapsulated in PLGA nanoparticles.* Int J Pharm, 2005. **298**(2): p. 354-60.

118. Kim, I.S., Lee, S.K., Park, Y.M., Lee, Y.B., Shin, S.C., Lee, K.C., and Oh, I.J., *Physicochemical characterization of poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles with polyethylenimine as gene delivery carrier.* Int J Pharm, 2005. **298**(1): p. 255-62.

119. Panyam, J., Zhou, W.Z., Prabha, S., Sahoo, S.K., and Labhasetwar, V., *Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery.* FASEB J, 2002. **16**(10): p. 1217-26.

120. Panyam, J. and Labhasetwar, V., *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue.* Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(3): p. 329-47.

121. Dubruel, P., Christiaens, B., Vanloo, B., Bracke, K., Rosseneu, M., Vandekerckhove, J., and Schacht, E., *Physicochemical and biological evaluation of cationic polymethacrylates as vectors for gene delivery.* Eur J Pharm Sci, 2003. **18**(3-4): p. 211-20.

122. Dubruel, P., Christiaens, B., Rosseneu, M., Vandekerckhove, J., Grooten, J., Goossens, V., and Schacht, E., *Buffering properties of cationic polymethacrylates are not the only key to successful gene delivery.* Biomacromolecules, 2004. **5**(2): p. 379-88.
123. Basarkar, A. and Singh, J., *Poly (lactide-co-glycolide)-polymethacrylate nanoparticles for intramuscular delivery of plasmid encoding interleukin-10 to prevent autoimmune diabetes in mice.* Pharm Res, 2009. **26**(1): p. 72-81.
124. Lynn, D.M. and Langer, R., *Degradable Poly(beta-amino esters): Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA.* Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(44): p. 10761-10768.
125. Little, S.R., Lynn, D.M., Ge, Q., Anderson, D.G., Puram, S.V., Chen, J., Eisen, H.N., and Langer, R., *Poly-beta amino ester-containing microparticles enhance the activity of nonviral genetic vaccines.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9534-9.
126. Little, S.R., Lynn, D.M., Puram, S.V., and Langer, R., *Formulation and characterization of poly (beta amino ester) microparticles for genetic vaccine delivery.* J Control Release, 2005. **107**(3): p. 449-62.
127. Walter, E., Moelling, K., Pavlovic, J., and Merkle, H.P., *Microencapsulation of DNA using poly(DL-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics.* J Control Release, 1999. **61**(3): p. 361-74.
128. Howard, K.A., Li, X.W., Somavarapu, S., Singh, J., Green, N., Atuah, K.N., Ozsoy, Y., Seymour, L.W., and Alpar, H.O., *Formulation of a microparticle carrier for oral polyplex-based DNA vaccines.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1674**(2): p. 149-57.
129. Oster, C.G., Kim, N., Grode, L., Barbu-Tudoran, L., Schaper, A.K., Kaufmann, S.H., and Kissel, T., *Cationic microparticles consisting of poly(lactide-co-glycolide) and polyethylenimine as carriers systems for parental DNA vaccination.* J Control Release, 2005. **104**(2): p. 359-77.
130. Kasturi, S.P., Sachaphibulkij, K., and Roy, K., *Covalent conjugation of polyethyleneimine on biodegradable microparticles for delivery of plasmid DNA vaccines.* Biomaterials, 2005. **26**(32): p. 6375-85.
131. Zhang, X.Q., Intra, J., and Salem, A.K., *Conjugation of polyamidoamine dendrimers on biodegradable microparticles for nonviral gene delivery.* Bioconjug Chem, 2007. **18**(6): p. 2068-76.

132. Kakade, S., Manickam, D.S., Handa, H., Mao, G., and Oupicky, D., *Transfection activity of layer-by-layer plasmid DNA/poly(ethylenimine) films deposited on PLGA microparticles.* Int J Pharm, 2009. **365**(1-2): p. 44-52.

133. Cohen, H., Levy, R.J., Gao, J., Fishbein, I., Kousaev, V., Sosnowski, S., Slomkowski, S., and Golomb, G., *Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles.* Gene Ther, 2000. **7**(22): p. 1896-905.

134. Oster, C.G., Wittmar, M., Unger, F., Barbu-Tudoran, L., Schaper, A.K., and Kissel, T., *Design of amine-modified graft polyesters for effective gene delivery using DNA-loaded nanoparticles.* Pharm Res, 2004. **21**(6): p. 927-31.

135. Bivas-Benita, M., Romeijn, S., Junginger, H.E., and Borchard, G., *PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium.* Eur J Pharm Biopharm, 2004. **58**(1): p. 1-6.

136. Csaba, N., Sanchez, A., and Alonso, M.J., *PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery.* J Control Release, 2006. **113**(2): p. 164-72.

137. Gvili, K., Benny, O., Danino, D., and Machluf, M., *Poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for DNA delivery: waiving preparation complexity and increasing efficiency.* Biopolymers, 2007. **85**(5-6): p. 379-91.

138. Oster, C.G., Wittmar, M., Bakowsky, U., and Kissel, T., *DNA nano-carriers from biodegradable cationic branched polyesters are formed by a modified solvent displacement method.* J Control Release, 2006. **111**(3): p. 371-81.

139. Chumakova, O.V., Liopo, A.V., Andreev, V.G., Cicenaite, I., Evers, B.M., Chakrabarty, S., Pappas, T.C., and Esenaliev, R.O., *Composition of PLGA and PEI/DNA nanoparticles improves ultrasound-mediated gene delivery in solid tumors in vivo.* Cancer Lett, 2008. **261**(2): p. 215-25.

140. Kanazawa, T., Takashima, Y., Murakoshi, M., Nakai, Y., and Okada, H., *Enhancement of gene transfection into human dendritic cells using cationic PLGA nanospheres with a synthesized nuclear localization signal.* Int J Pharm, 2009. **379**(1): p. 187-95.

141. Zhou, X. and Huang, L., *DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action.* Biochim Biophys Acta, 1994. **1189**(2): p. 195-203.

142. Villemejane, J. and Mir, L.M., *Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications.* Br J Pharmacol, 2009. **157**(2): p. 207-19.

143. Al-Dosari, M.S. and Gao, X., *Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress.* AAPS J, 2009. **11**(4): p. 671-81.
144. Klein, R.M., Wolf, E.D., Wu, R., and Sanford, J.C., *High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987.* Biotechnology, 1992. **24**: p. 384-6.
145. Yang, N.S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., and McCabe, D., *In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(24): p. 9568-72.
146. Williams, R.S., Johnston, S.A., Riedy, M., DeVit, M.J., McElligott, S.G., and Sanford, J.C., *Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(7): p. 2726-30.
147. Lee, P.W., Peng, S.F., Su, C.J., Mi, F.L., Chen, H.L., Wei, M.C., Lin, H.J., and Sung, H.W., *The use of biodegradable polymeric nanoparticles in combination with a low-pressure gene gun for transdermal DNA delivery.* Biomaterials, 2008. **29**(6): p. 742-51.
148. Larregina, A.T., Watkins, S.C., Erdos, G., Spencer, L.A., Storkus, W.J., Beer Stolz, D., and Falo, L.D., Jr., *Direct transfection and activation of human cutaneous dendritic cells.* Gene Ther, 2001. **8**(8): p. 608-17.
149. Kim, H.J., Greenleaf, J.F., Kinnick, R.R., Bronk, J.T., and Bolander, M.E., *Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells.* Hum Gene Ther, 1996. **7**(11): p. 1339-46.
150. Wang, X., Liang, H.D., Dong, B., Lu, Q.L., and Blomley, M.J., *Gene transfer with microbubble ultrasound and plasmid DNA into skeletal muscle of mice: comparison between commercially available microbubble contrast agents.* Radiology, 2005. **237**(1): p. 224-9.
151. Huber, P.E., Mann, M.J., Melo, L.G., Ehsan, A., Kong, D., Zhang, L., Rezvani, M., Peschke, P., Jolesz, F., Dzau, V.J., and Hynynen, K., *Focused ultrasound (HIFU) induces localized enhancement of reporter gene expression in rabbit carotid artery.* Gene Ther, 2003. **10**(18): p. 1600-7.
152. Fischer, A.J., Stanke, J.J., Omar, G., Askwith, C.C., and Burry, R.W., *Ultrasound-mediated gene transfer into neuronal cells.* J Biotechnol, 2006. **122**(4): p. 393-411.
153. Tao, W., Wilkinson, J., Stanbridge, E.J., and Berns, M.W., *Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the cell membrane.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(12): p. 4180-4.
154. Budker, V., Zhang, G., Knechtle, S., and Wolff, J.A., *Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes.* Gene Ther, 1996. **3**(7): p. 593-8.

155. Zhang, G., Budker, V., Williams, P., Subbotin, V., and Wolff, J.A., *Efficient expression of naked dna delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates.* Hum Gene Ther, 2001. **12**(4): p. 427-38.

156. Wells, D.J., *Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods.* Gene Ther, 2004. **11**(18): p. 1363-9.

157. Fabre, J.W., Grehan, A., Whitehorne, M., Sawyer, G.J., Dong, X., Salehi, S., Eckley, L., Zhang, X., Seddon, M., Shah, A.M., Davenport, M., and Rela, M., *Hydrodynamic gene delivery to the pig liver via an isolated segment of the inferior vena cava.* Gene Ther, 2008. **15**(6): p. 452-62.

158. Suda, T., Suda, K., and Liu, D., *Computer-assisted hydrodynamic gene delivery.* Mol Ther, 2008. **16**(6): p. 1098-104.

159. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P.H., *Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields.* EMBO J, 1982. **1**(7): p. 841-5.

160. Fromm, M., Taylor, L.P., and Walbot, V., *Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(17): p. 5824-8.

161. Sersa, G. and Miklavcic, D., *Electrochemotherapy of tumours.* J Vis Exp, 2008(22).

162. Norum, O.J., Selbo, P.K., Weyergang, A., Giercksky, K.E., and Berg, K., *Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: from bench towards bedside medicine.* J Photochem Photobiol B, 2009. **96**(2): p. 83-92.

163. Berg, K., Selbo, P.K., Prasmickaite, L., Tjelle, T.E., Sandvig, K., Moan, J., Gaudernack, G., Fodstad, O., Kjolsrud, S., Anholt, H., Rodal, G.H., Rodal, S.K., and Hogset, A., *Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol.* Cancer Res, 1999. **59**(6): p. 1180-3.

164. Selbo, P.K., Hogset, A., Prasmickaite, L., and Berg, K., *Photochemical internalisation: a novel drug delivery system.* Tumour Biol, 2002. **23**(2): p. 103-12.

165. Hogset, A., Prasmickaite, L., Selbo, P.K., Hellum, M., Engesaeter, B.O., Bonsted, A., and Berg, K., *Photochemical internalisation in drug and gene delivery.* Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(1): p. 95-115.

166. De Jong, W.H. and Borm, P.J., *Drug delivery and nanoparticles:applications and hazards.* Int J Nanomedicine, 2008. **3**(2): p. 133-49.

167. Hogset, A., Prasmickaite, L., Hellum, M., Engesaeter, B.O., Olsen, V.M., Tjelle, T.E., Wheeler, C.J., and Berg, K., *Photochemical transfection: a technology for efficient light-directed gene delivery.* Somat Cell Mol Genet, 2002. **27**(1-6): p. 97-113.

168. Ndoye, A., Merlin, J.L., Leroux, A., Dolivet, G., Erbacher, P., Behr, J.P., Berg, K., and Guillemin, F., *Enhanced gene transfer and cell death following p53 gene transfer using photochemical internalisation of glucosylated PEI-DNA complexes.* J Gene Med, 2004. **6**(8): p. 884-94.

169. Ndoye, A., Bouali, S., Dolivet, G., Leroux, A., Erbacher, P., Behr, J.P., Berg, K., Guillemin, F., and Merlin, J.L., *Sustained gene transfer and enhanced cell death following glucosylated-PEI-mediated p53 gene transfer with photochemical internalisation in p53-mutated head and neck carcinoma cells.* Int J Oncol, 2004. **25**(6): p. 1575-81.

170. Densmore, C.L., *Polyethyleneimine-based gene therapy by inhalation.* Expert Opin Biol Ther, 2003. **3**(7): p. 1083-92.

171. Fessi, H., Piusieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., and Benita, S., *Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement.* Int J Pharm, 1989. **55**(1).

172. Bodmeier, R., Chen, H., Tyle, P., and Jarosz, P., *Spontaneous formation of drug-containing acrylic nanoparticles.* J Microencapsul, 1991. **8**(2): p. 161-170.

173. Gargouri, M., Sapin, A., Bouli, S., Becuwe, P., Merlin, J.L., and Maincent, P., *Optimization of a new non-viral vector for transfection: Eudragit nanoparticles for the delivery of a DNA plasmid.* Technol Cancer Res Treat, 2009. **8**(6): p. 433-44.

174. Esposito, E., Sebben, S., Cortesi, R., Menegatti, E., and Nastruzzi, C., *Preparation and characterization of cationic microspheres for gene delivery.* Int J Pharm, 1999. **189**(1): p. 29-41.

175. Maurice-Duelli, A., Ndoye, A., Bouali, S., Leroux, A., and Merlin, J.L., *Enhanced cell growth inhibition following PTEN nonviral gene transfer using polyethylenimine and photochemical internalization in endometrial cancer cells.* Technol Cancer Res Treat, 2004. **3**(5): p. 459-65.

176. Prasmickaite, L., Hogset, A., Tjelle, T.E., Olsen, V.M., and Berg, K., *Role of endosomes in gene transfection mediated by photochemical internalisation (PCI).* J Gene Med, 2000. **2**(6): p. 477-88.

177. Prasmickaite, L., Hogset, A., Selbo, P.K., Engesaeter, B.O., Hellum, M., and Berg, K., *Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: a new strategy for cancer therapy.* Br J Cancer, 2002. **86**(4): p. 652-7.

178. Arnida, Nishiyama, N., Kanayama, N., Jang, W.D., Yamasaki, Y., and Kataoka, K., *PEGylated gene nanocarriers based on block catiomers bearing ethylenediamine repeating units directed to remarkable enhancement of photochemical transfection.* J Control Release, 2006. **115**(2): p. 208-15.

179. Nishiyama, N., Arnida, Jang, W.D., Date, K., Miyata, K., and Kataoka, K., *Photochemical enhancement of transgene expression by polymeric micelles incorporating plasmid DNA and dendrimer-based photosensitizer.* J Drug Target, 2006. **14**(6): p. 413-24.

180. Kloeckner, J., Boeckle, S., Persson, D., Roedl, W., Ogris, M., Berg, K., and Wagner, E., *DNA polyplexes based on degradable oligoethylenimine-derivatives: combination with EGF receptor targeting and endosomal release functions.* J Control Release, 2006. **116**(2): p. 115-22.

181. Shieh, M.J., Peng, C.L., Lou, P.J., Chiu, C.H., Tsai, T.Y., Hsu, C.Y., Yeh, C.Y., and Lai, P.S., *Non-toxic phototriggered gene transfection by PAMAM-porphyrin conjugates.* J Control Release, 2008. **129**(3): p. 200-6.

182. Hellum, M., Hogset, A., Engesaeter, B.O., Prasmickaite, L., Stokke, T., Wheeler, C., and Berg, K., *Photochemically enhanced gene delivery with cationic lipid formulations.* Photochem Photobiol Sci, 2003. **2**(4): p. 407-11.

183. Ditto, A.J., Shah, P.N., and Yun, Y.H., *Non-viral gene delivery using nanoparticles.* Expert Opin Drug Deliv, 2009. **6**(11): p. 1149-60.

184. Mohammed, A.R., Bramwell, V.W., Coombes, A.G., and Perrie, Y., *Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products.* Methods, 2006. **40**(1): p. 30-8.

185. Cortesi, R., Mischiati, C., Borgatti, M., Breda, L., Romanelli, A., Saviano, M., Pedone, C., Gambari, R., and Nastruzzi, C., *Formulations for natural and peptide nucleic acids based on cationic polymeric submicron particles.* AAPS J, 2004. **6**(1): p. 10-21.

186. Stanic, V., Arntz, Y., Richard, D., Affolter, C., Nguyen, I., Crucifix, C., Schultz, P., Baehr, C., Frisch, B., and Ogier, J., *Filamentous condensation of DNA induced by pegylated poly-L-lysine and transfection efficiency.* Biomacromolecules, 2008. **9**(7): p. 2048-55.

187. Rimann, M., Luhmann, T., Textor, M., Guerino, B., Ogier, J., and Hall, H., *Characterization of PLL-g-PEG-DNA nanoparticles for the delivery of therapeutic DNA.* Bioconjug Chem, 2008. **19**(2): p. 548-57.

188. Farrell, L.L., Pepin, J., Kucharski, C., Lin, X., Xu, Z., and Uludag, H., *A comparison of the effectiveness of cationic polymers poly-L-lysine (PLL) and polyethylenimine (PEI) for non-viral delivery of plasmid DNA to bone marrow stromal cells (BMSC).* Eur J Pharm Biopharm, 2007. **65**(3): p. 388-97.

189. Nann, T., *Phase-transfer of CdSe@ZnS quantum dots using amphiphilic hyperbranched polyethylenimine.* Chem Commun (Camb), 2005(13): p. 1735-6.

190. Ungaro, F., De Rosa, G., Miro, A., and Quaglia, F., *Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations.* J Pharm Biomed Anal, 2003. **31**(1): p. 143-9.

191. Son, S. and Kim, W.J., *Biodegradable nanoparticles modified by branched polyethylenimine for plasmid DNA delivery.* Biomaterials, 2010. **31**(1): p. 133-43.

192. Wasan, E.K., Reimer, D.L., and Bally, M.B., *Plasmid DNA is protected against ultrasonic cavitation-induced damage when complexed to cationic liposomes.* J Pharm Sci, 1996. **85**(4): p. 427-33.

193. Zobel, H.P., Werner, D., Gilbert, M., Noe, C.R., Stieneker, F., Kreuter, J., and Zimmer, A., *Effect of ultrasonication on the stability of oligonucleotides adsorbed on nanoparticles and liposomes.* J Microencapsul, 1999. **16**(4): p. 501-9.

194. Takashima, Y., Saito, R., Nakajima, A., Oda, M., Kimura, A., Kanazawa, T., and Okada, H., *Spray-drying preparation of microparticles containing cationic PLGA nanospheres as gene carriers for avoiding aggregation of nanospheres.* Int J Pharm, 2007. **343**(1-2): p. 262-9.

195. Patil, Y. and Panyam, J., *Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing.* Int J Pharm, 2009. **367**(1-2): p. 195-203.

196. Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H.D., and Golomb, G., *A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles.* J Control Release, 2009. **133**(2): p. 90-5.

197. Zhao, X., Pan, F., Zhang, Z., Grant, C., Ma, Y., Armes, S.P., Tang, Y., Lewis, A.L., Waigh, T., and Lu, J.R., *Nanostructure of polyplexes formed between cationic diblock copolymer and antisense oligodeoxynucleotide and its influence on cell transfection efficiency.* Biomacromolecules, 2007. **8**(11): p. 3493-502.

198. Uchida, M., Li, X.W., Mertens, P., and Alpar, H.O., *Transfection by particle bombardment: delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(8): p. 754-64.

199. DiFranco, M., Quinonez, M., Capote, J., and Vergara, J., *DNA transfection of mammalian skeletal muscles using in vivo electroporation.* J Vis Exp, 2009(32).

200. Gao, Y., Xu, Z., Chen, S., Gu, W., Chen, L., and Li, Y., *Arginine-chitosan/DNA self-assemble nanoparticles for gene delivery: In vitro characteristics and transfection efficiency.* Int J Pharm, 2008. **359**(1-2): p. 241-6.

201. Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E.C., Tilkins, M.L., Price, P.J., and Ciccarone, V.C., *Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications.* Methods, 2004. **33**(2): p. 95-103.

202. Zhang, Z., Yang, C., Duan, Y., Wang, Y., Liu, J., Wang, L., and Kong, D., *Poly(ethylene glycol) analogs grafted with low molecular weight poly(ethylene imine) as non-viral gene vectors.* Acta Biomater, 2010. **6**(7): p. 2650-7.

203. Wang, Y., Ke, C.Y., Weijie Beh, C., Liu, S.Q., Goh, S.H., and Yang, Y.Y., *The self-assembly of biodegradable cationic polymer micelles as vectors for gene transfection.* Biomaterials, 2007. **28**(35): p. 5358-68.

204. Maurisse, R., De Semir, D., Emamekhoo, H., Bedayat, B., Abdolmohammadi, A., Parsi, H., and Gruenert, D.C., *Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages.* BMC Biotechnol, 2010. **10**: p. 9.

205. Patil, S.D., Rhodes, D.G., and Burgess, D.J., *Anionic liposomal delivery system for DNA transfection.* AAPS J, 2004. **6**(4): p. e29.

206. Kim, S.H., Jeong, J.H., Chun, K.W., and Park, T.G., *Target-specific cellular uptake of PLGA nanoparticles coated with poly(L-lysine)-poly(ethylene glycol)-folate conjugate.* Langmuir, 2005. **21**(19): p. 8852-7.

207. Wang, Y., Kong, W., Song, Y., Duan, Y., Wang, L., Steinhoff, G., Kong, D., and Yu, Y., *Polyamidoamine dendrimers with a modified Pentaerythritol core having high efficiency and low cytotoxicity as gene carriers.* Biomacromolecules, 2009. **10**(3): p. 617-22.

208. Delie, F., Berton, M., Allemann, E., and Gurny, R., *Comparison of two methods of encapsulation of an oligonucleotide into poly(D,L-lactic acid) particles.* Int J Pharm, 2001. **214**(1-2): p. 25-30.

209. Park, Y.M., Shin, B.A., and Oh, I.J., *Poly(L-lactic acid)/polyethylenimine nanoparticles as plasmid DNA carriers.* Arch Pharm Res, 2008. **31**(1): p. 96-102.

210. Godbey, W.T., Wu, K.K., and Mikos, A.G., *Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery.* J Control Release, 1999. **60**(2-3): p. 149-60.

211. Zhu, J., Tang, A., Law, L.P., Feng, M., Ho, K.M., Lee, D.K., Harris, F.W., and Li, P., *Amphiphilic core-shell nanoparticles with poly(ethylenimine) shells as potential gene delivery carriers.* Bioconjug Chem, 2005. **16**(1): p. 139-46.

212. Godbey, W.T. and Mikos, A.G., *Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes.* J Control Release, 2001. **72**(1-3): p. 115-25.

213. Kommareddy, S., Tiwari, S.B., and Amiji, M.M., *Long-circulating polymeric nanovectors for tumor-selective gene delivery.* Technol Cancer Res Treat, 2005. **4**(6): p. 615-25.

214. Carriere, M., Escriou, V., Savarin, A., and Scherman, D., *Coupling of importin beta binding peptide on plasmid DNA: transfection efficiency is increased by modification of lipoplex's physico-chemical properties.* BMC Biotechnol, 2003. **3**: p. 14.

215. Rebuffat, A., Bernasconi, A., Ceppi, M., Wehrli, H., Verca, S.B., Ibrahim, M., Frey, B.M., Frey, F.J., and Rusconi, S., *Selective enhancement of gene transfer by steroid-mediated gene delivery.* Nat Biotechnol, 2001. **19**(12): p. 1155-61.

216. Rebuffat, A.G., Nawrocki, A.R., Nielsen, P.E., Bernasconi, A.G., Bernal-Mendez, E., Frey, B.M., and Frey, F.J., *Gene delivery by a steroid-peptide nucleic acid conjugate.* FASEB J, 2002. **16**(11): p. 1426-8.

217. Akasaka, T., Matsuura, K., Emi, N., and Kobayashi, K., *Conjugation of plasmid DNAs with lactose via diazocoupling enhances resistance to restriction enzymes and acquires binding affinity to galactose-specific lectin.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(2): p. 323-8.

218. Remy, J.S., Kichler, A., Mordvinov, V., Schuber, F., and Behr, J.P., *Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1744-8.

219. Kircheis, R., Kichler, A., Wallner, G., Kursa, M., Ogris, M., Felzmann, T., Buchberger, M., and Wagner, E., *Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery.* Gene Ther, 1997. **4**(5): p. 409-18.

220. Bechet, D., Tirand, L., Faivre, B., Plenat, F., Bonnet, C., Bastogne, T., Frochot, C., Guillemin, F., and Barberi-Heyob, M., *Neuropilin-1 targeting photosensitization-induced early stages of thrombosis via tissue factor release.* Pharm Res, 2010. **27**(3): p. 468-79.

221. Nishiyama, N., Iriyama, A., Jang, W.D., Miyata, K., Itaka, K., Inoue, Y., Takahashi, H., Yanagi, Y., Tamaki, Y., Koyama, H., and Kataoka, K., *Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer.* Nat Mater, 2005. **4**(12): p. 934-41.

222. Ghonaim, H.M., Li, S., and Blagbrough, I.S., *N1,N12-Diacyl spermines: SAR studies on non-viral lipopolyamine vectors for plasmid DNA and siRNA formulation.* Pharm Res, 2010. **27**(1): p. 17-29.

223. Cun, D., Foged, C., Yang, M., Frokjaer, S., and Nielsen, H.M., *Preparation and characterization of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles for siRNA delivery.* Int J Pharm, 2009. **390**(1): p. 70-5.

224. Yuan, X., Li, L., Rathinavelu, A., Hao, J., Narasimhan, M., He, M., Heitlage, V., Tam, L., Viqar, S., and Salehi, M., *SiRNA drug delivery by biodegradable polymeric nanoparticles.* J Nanosci Nanotechnol, 2006. **6**(9-10): p. 2821-8.

225. Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Meng, H., Kabehie, S., George, S., Zink, J.I., and Nel, A.E., *Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs.* ACS Nano, 2009. **3**(10): p. 3273-86.

226. Mevel, M., Kamaly, N., Carmona, S., Oliver, M.H., Jorgensen, M.R., Crowther, C., Salazar, F.H., Marion, P.L., Fujino, M., Natori, Y., Thanou, M., Arbuthnot, P., Yaouanc, J.J., Jaffres, P.A., and Miller, A.D., *DODAG; a versatile new cationic lipid that mediates efficient delivery of pDNA and siRNA.* J Control Release, 2010. **143**(2): p. 222-32.

227. Katas, H., Cevher, E., and Alpar, H.O., *Preparation of polyethyleneimine incorporated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles by spontaneous emulsion diffusion method for small interfering RNA delivery.* Int J Pharm, 2009. **369**(1-2): p. 144-54.