

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

**Transfection de cellules en culture avec un mélange de polymères de méthacrylate:
étude des étapes précoces de l'internalisation des complexes polymères/ADN**

Stéphenne, Virginie

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Transfection de cellules en culture avec un mélange de polymères de méthacrylate. Etude des
étapes précoces de l'internalisation des complexes polymères/ADN.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Virginie Stephenne

Juin 2003

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Transfection de cellules en culture avec un mélange de polymères de méthacrylate. Etude des étapes précoces de l'internalisation des complexes polymères/ADN

STEPHENNE Virginie

Résumé

Ce mémoire s'intègre dans le cadre du projet Polyplex (financé par la Région Wallonne), qui vise à mettre au point un vecteur de transfection synthétique à base de polymère de méthacrylate, qui soit non toxique et hémocompatible. Le vecteur proposé est composé de deux polymères : un polymère de méthacrylate de diméthylaminoéthyl (MADAM) (pour condenser l'ADN) et un copolymère de MADAM et de poly(oxyde d'éthylène), nécessaire pour empêcher les interactions indésirables avec l'environnement et permettre la transfection des cellules en présence de sérum. Au cours de ce travail, des polymères de ce type ont été utilisés de manière séquentielle pour transfecter des cellules Cos-7, dans le but d'identifier si une des étapes de l'internalisation des complexes est limitante, et ce dans l'espoir de pouvoir orienter au mieux la synthèse de ces polymères pour une transfection encore plus efficace. Par l'utilisation d'agents qui interfèrent avec les étapes précoces de l'endocytose (souvent énoncée comme voie d'entrée des polyplexes dans la cellule), nous avons montré que la sortie des complexes de l'endosome constitue une étape limitante de l'efficacité de transfection des polymères de méthacrylate. D'autre part, le suivi du cheminement intracellulaire de complexes formés à partir d'ADNp fluorescent, par immunocytochimie et analyse en microscopie confocale, a permis de confirmer l'association de ces complexes avec des structures de type « endosome-like ».

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2003

Promoteur: M. Raes

Remerciements

Je souhaite remercier chaleureusement tous les membres du projet Polyplex et particulièrement Sabine PIROTON et Martine RAES pour leurs précieux conseils, leurs encouragements, leur disponibilité, leur patience, et leur encadrement.

Je souhaite également remercier l'ensemble de mes professeurs pour l'intérêt qu'ils ont portés à notre formation.

Je pense également à mes parents, à mes collègues et à toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidée, encouragée et soutenue au cours de mon parcours universitaire et durant la rédaction de ce mémoire.

I. INTRODUCTION 1

I.1. LA TRANSFECTION : APPLICATIONS ET DIFFICULTES	1
I.2. LES VECTEURS VIRAUX	1
I.3. LES SYSTEMES DE TRANSFERT NON-VIRAUX	2
I.3.1. Les méthodes physiques de transfert d'ADN	3
I.3.2. Les vecteurs synthétiques	3
I.3.2.1. Les lipides cationiques	4
I.3.2.2. Les polymères cationiques	4
I.4. LA TRANSFECTION : UN PROCESSUS MULTI-ETAPES QUI SE HEURTE A PLUSIEURS BARRIERES	7
I.4.1. L'opsonisation et l'activation du complément.....	8
I.4.2. L'internalisation dans la cellule	8
I.4.3. La sortie de l'endosome.....	9
I.4.4. Le transport à travers le cytoplasme.....	9
I.4.5. L'entrée dans le noyau.....	10
I.5. AMELIORATION DES VECTEURS SYNTHETIQUES	11
I.5.1. La PEGylation.....	11
I.5.2. Le ciblage cellulaire.....	12
I.5.2.1. Un ciblage passif.....	12
I.5.2.2. Un ciblage actif.....	12
I.5.3. Le relargage de l'endosome	13
I.5.4. Le transport dans le cytoplasme.....	14
I.5.5. L'entrée dans le noyau.....	14
I.6. INTERNALISATION DES POLYPLEXES ET VOIES D'ENDOCYTOSE.....	16
I.6.1. La phagocytose.....	16
I.6.2. La macropinocytose.....	16
I.6.3. Les voies de pinocytose dépendantes de la clathrine	17
I.6.4. L'endocytose dépendante des cavéoles	17
I.6.5. L'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles.....	18
I.6.6. Le trajet endocyttaire : un chemin complexe	18
I.6.7. Les agents interférant avec le processus d'endocytose.....	21
I.6.7.1 Inhibiteurs de la PI3K	21
I.6.7.2 Agents interférant avec le cytosquelette d'actine	21
I.6.7.3 Agents prévenant l'acidification des vésicules endosomiales.....	22
I.7. LE PROJET POLYPLEXE ET OBJECTIFS DU MEMOIRE	23

II. MATERIEL ET METHODES 26

II.1. CULTURE CELLULAIRE.....	26
II.1.1. Modèle cellulaire.....	26
II.1.2. Matériels et solutions.....	26
II.1.3. Méthode	26
II.2. PREPARATION DES POLYMERES.....	27
II.3. TRANSFECTION DES CELLULES Cos-7 PAR LES COMPLEXES POLYMERES/pCMV β	27
II.3.1. Principe	27
II.3.2. Matériels	27
II.3.3. Méthode	28
II.4. REVELATION DE L'ACTIVITE β -GALACTOSIDASE	29
II.4.1. Principe.....	29

II.4.2. Matériels	29
II.4.3. Méthode	30
II.5. DOSAGE DE PROTEINES (BRADFORD)	30
II.5.1. Principe	30
II.5.2. Matériels	31
II.5.3. Méthode	31
II.6. ANALYSE STATISTIQUES DES RESULTATS.....	31
II.7. ETUDE DU CHEMINEMENT INTRACELLULAIRE DES COMPLEXES IMMUNOCYTOCHIMIE	32
II.7.1. Principe	32
II.7.2. Matériels	32
II.7.3. Méthode	33
II.7.4. Analyse au microscope confocal.....	33
III. RESULTATS ET DISCUSSION	35
III.1. PRESENTATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES UTILISEES.....	35
III.1.1. Le gène rapporteur	35
III.1.2. L'agent transfectant de référence.....	35
III.1.3. Description des polymères de méthacrylate	36
III.1.4. Transfection des cellules Cos-7 avec les complexes SEMO B64/pCMV β	36
III.1.5. Les complexes ternaires MIWA A61 [SEMO B64/pCMV β]	37
III.1.6. Estimation de l'efficacité de transfection par 2 méthodes de révélation	38
III.2. ETUDE DES ETAPES PRECOCES DU CHEMINEMENT INTRACELLULAIRE DES COMPLEXES FORMES A PARTIR DE DEUX TYPES DE POLYMERES	39
III.2.1. Utilisation d'agents interférant avec les étapes précoces d'endocytose.....	39
III.2.1.1. La cytochalasine B	40
III.2.1.2. Le LY294002	41
III.2.1.3. La chloroquine	42
III.2.1.4. La bafilomycine A1	43
III.2.1.5. Discussion.....	44
III.2.2. Etude du cheminement intracellulaire des complexes marqués via la microscopie confocale	48
III.2.2.1. Transfection des cellules Cos-7 sur un support en verre	48
III.2.2.2. Mises au point des divers marquages	50
III.2.2.3. Transfection des cellules Cos-7 avec les complexes ternaires MIWA A61 [SEMO B64/pCMV β] et marquage des endosomes précoces et tardifs.....	51
III.2.2.4. Transfection des cellules Cos-7 avec les complexes ternaires MIWA A61 [SEMO B64/pCMV β] et marquages du noyau	52
III.2.2.5. Discussion	53

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES **54**

I. INTRODUCTION

I.1 La transfection : applications et difficultés.

L'introduction de matériel génétique exogène au sein des cellules eucaryotes est un processus appelé **transfection**.

Cette technique peut être appliquée sur des cellules en culture (*in vitro*) et elle est largement mise à profit en recherche expérimentale, ou directement dans l'organisme (*in vivo*) en tant que nouvel outil thérapeutique.

En effet, la transfection est une étape clé de la **thérapie génique** dont le principe est d'introduire un « gène médicament » au sein de cellules cibles afin de :

- supplanter un gène déficient responsable d'une maladie génétique,
- inhiber ou stimuler la synthèse d'une protéine donnée,
- favoriser un rejet de tumeur, dans ce cas le gène introduit est dit « gène suicide »,
- stimuler la réponse immunitaire (par exemple en thérapie anti-cancéreuse),
- prévenir la mort cellulaire (dans le cas des maladies neurodégénératives, telles que les maladies de Parkinson, Alzheimer,...).

Enfin, de nombreuses protéines sont actuellement utilisées en **biopharmacie** ou pour la vaccination; elles doivent être produites dans des cellules eucaryotes préalablement transfectées avec des vecteurs porteurs des gènes qui les encodent.

Toutes ces recherches et réalisations nécessitent des techniques de transfection très efficaces.

Malgré la variété d'approches existantes, l'efficacité de transfection reste souvent faible, les protocoles utilisés sont parfois laborieux et donnent des résultats pas toujours reproductibles.

Le problème majeur est la difficulté de **vectoriser** l'ADN étranger jusqu'au noyau de la cellule cible. Il y a deux raisons à cela :

- l'ADN est une molécule anionique, hydrophile et de grand poids moléculaire, qui n'a pas tendance naturellement à traverser les membranes biologiques, elles même chargées négativement.
- l'ADN va rencontrer de nombreux obstacles lors de son cheminement vers le noyau.

C'est pourquoi, l'essentiel des recherches actuelles portent sur l'élaboration de **systèmes de transfert de gènes**, permettant à cet ADN d'entrer dans les cellules et d'atteindre le noyau afin d'y être transcrit.

Les systèmes utilisés en thérapie génique pour administrer des acides nucléiques sont généralement classés en deux grands types, selon leur origine : Les **vecteurs viraux et non viraux** (Anderson, 1998). Ces derniers peuvent être de nature mécanique ou chimique. Quelle que soit leur nature, les vecteurs doivent être sûrs, efficaces, capables d'exercer leur fonction dans des cellules qui se divisent moins et capables d'assurer l'expression prolongée du gène thérapeutique.

I.2 Les vecteurs viraux

A l'heure actuelle, approximativement 2/3 des protocoles cliniques de thérapie génique utilisent des vecteurs viraux. Ceux-ci sont constitués de génomes viraux desquels ont été retirées les séquences nécessaires à leur propagation et leur virulence (par exemple, les gènes E1 et E4 chez les adénovirus), remplacées par le gène d'intérêt thérapeutique.

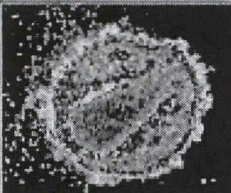
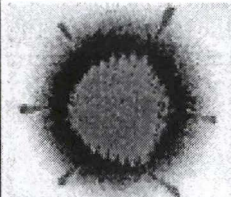
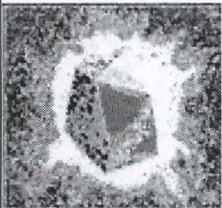
		
Rétrovirus 	Expression prolongée du gène inséré. Haute efficacité de transfection ex vivo. Nombreux essais cliniques ex vivo (159). Faible immunogénicité.	Faible efficacité de transfection in vivo liée à l'inactivation par les protéines du complément. Taille du gène inséré limitée (8 kb). Transfection restreinte aux cellules en division (excepté les lentivirus tel que le HIV). Risque de mutation insertionnelles.
Adénovirus 	Taux de transfection très élevé ex vivo et in vivo. Capacité d'infecter des cellules en ou non. Nombreux essais cliniques réalisés (58). Transfert de séquences d'ADN de grande taille (jusqu'à 30 kb). Efficacité prouvée	Expression transitoire (15 jours maximum). Administrations répétées problématiques, car elles entraînent une forte réaction immunitaire. Difficultés de production, contrôle qualité et stockage des vecteurs.
Virus adéno-associés (AAV) 	Transduction efficace pour une grande variété de cellules in vivo. Expression très longue in vivo. Faible caractère immunogène.	Taille du gène inséré limitée (4,5 kb) Production et contrôle de qualité très difficiles Peu d'essais cliniques (4). Risques de mutagenèse suite à une mauvaise insertion Administrations répétées peu efficaces car la réponse immunitaire par les anticorps anti AAV neutralise les vecteurs.

Tableau I.1. Tableau reprenant les avantages et les inconvénients des vecteurs viraux les plus souvent utilisés en thérapie génique.

Ils peuvent être préparés à partir de différents virus, tels que les rétrovirus (RT), les adénovirus ou les virus adénoassociés (AAV)..., qui possèdent des avantages différents repris dans le tableau I.1.

Ils sont reconnus particulièrement pour leur grande efficacité à délivrer du matériel génétique (ADN ou ARN) dans des cellules spécifiques. Cependant, leur utilisation clinique se heurte principalement à des problèmes de fiabilité de production et de biosécurité.

Selon le vecteur utilisé, le gène thérapeutique introduit dans le noyau reste sous forme d'épisome (ex : adénovirus et virus adéno-associés) ou est intégré dans le génome de la cellule hôte (ex : rétrovirus). Dans le premier cas, l'expression du transgène est transitoire et celui-ci a donc tendance à disparaître au fil des divisions cellulaires. Pour maintenir une expression prolongée, il est nécessaire de répéter l'administration, ce qui augmente les risques de réponse immunitaire.

L'intégration du transgène dans le génome de la cellule peut être vue a priori comme un avantage et l'assurance d'une expression prolongée de la protéine thérapeutique. Cependant il se développe actuellement une réticence à utiliser les rétrovirus *in vivo* pour des raisons de sécurité liées à l'insertion aléatoire du gène thérapeutique dans l'ADN chromosomique. Cela peut dans certains cas conduire à des disruptions de gènes ou des perturbations dans la régulation et l'expression de certains gènes, favorisant un processus de cancérisation. Un cas récemment rapporté concerne l'essai clinique mené en 1999 par l'équipe du professeur Alain Fischer. Des « enfants bulles », c'est-à-dire atteints d'une grave maladie génétique, appelée le déficit immunitaire combiné sévère (DICS) lié au chromosome X, ont été soignés par thérapie génique. Dans cette maladie, le gène codant pour la chaîne γ c des récepteurs des cytokines IL 2, 4, 7, 9, et 15 est muté, entraînant un défaut de production des lymphocytes T et NK (Cavazzana-Calvo et al, 2000). Ces enfants ne peuvent entrer en contact avec le moindre antigène, c'est pourquoi, ils étaient confinés dans des bulles protectrices, sous atmosphère stérile. Cet essai réalisé en France à l'hôpital Necker, consistait à prélever des cellules souches de la moëlle osseuse des patients, d'y introduire le gène fonctionnel γ c via un vecteur rétroviral dérivé du virus moloney (étape *ex vivo*), puis de les réinjecter aux même patients (autogreffe). Durant les deux années qui ont suivi, l'expression de ces récepteurs γ c nécessaires à la différenciation des lymphocytes T et NK est redevenue normale, ce qui a permis de restaurer l'immunité des patients. Malheureusement, depuis peu, il s'avère que deux des 11 enfants traités ont développé une forme atypique de leucémie. Une analyse moléculaire a révélé que le rétrovirus thérapeutique a été intégré dans la région LMO2 du chromosome 11p13, qui correspond à un oncogène fréquemment surexprimé dans les lymphomes (Lemoine, 2002).

Ce dramatique exemple montre que ces vecteurs comportent de sérieux risques de santé.

Face aux limites liées à l'utilisation de vecteurs viraux qui sont reprises dans le tableau I.1, de plus en plus d'équipes se focalisent sur le développement de techniques alternatives de transfert de gènes qui seraient plus sûres et tout aussi efficaces : ce sont les systèmes non viraux (Brown et al, 2001).

I.3 Les systèmes de transfert non-viraux

Les techniques de transfection utilisant des systèmes non viraux peuvent être classées en 2 catégories :

- les méthodes physiques pour transférer l'ADN nu,
- le transfert d'ADN plasmidique (ADNp) médié par des vecteurs chimiques tels que les lipides ou polymères cationiques.

La voie d'administration détermine le nombre de barrières qui doivent être franchies par les vecteurs non viraux avant d'atteindre le noyau. Dans le premier cas, l'ADN peut être directement injecté dans le cytoplasme ou dans le noyau, alors que les vecteurs chimiques passent par des étapes supplémentaires associées à leur mode d'internalisation par la cellule.

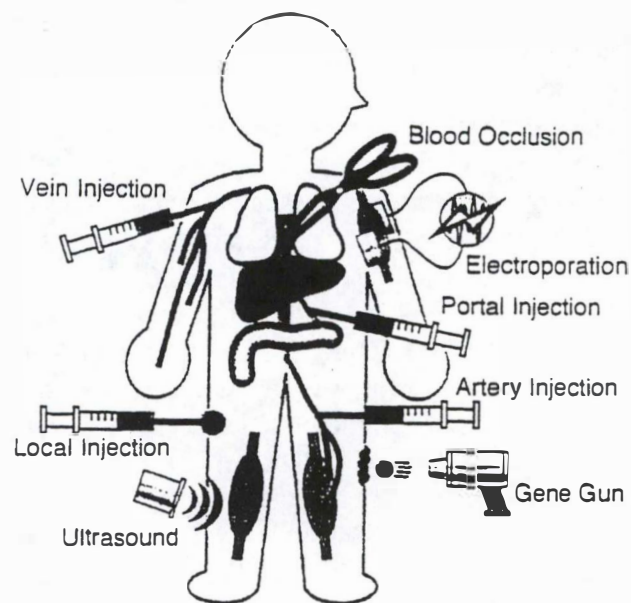


Figure I.1. Représentation schématique des différentes méthodes utilisées pour le transfert d'ADN nu (Niidome et Huang, 2002).

I.3.1 Les méthodes physiques de transfert d'ADN

Malgré la taille et la charge des molécules d'ADN, il est possible de transfecter des cellules *in vivo* avec de l'ADN nu, sous forme de plasmide, sans l'aide de molécules « carrier ». La voie d'administration la plus simple est l'**injection**, soit directement dans le tissu (tumeur, foie, thyroïde, muscle squelettique ou cardiaque, peau), soit de manière systémique, par la voie intravasculaire. L'**injection** seule donne des taux de transfection très faible, c'est pourquoi elle est souvent combinée à d'autres méthodes physiques, résumées à la figure I.1. :

- **l'électroporation** consiste à appliquer des impulsions électriques de manière contrôlée pour faciliter la perméabilisation des cellules (Somari et al, 2000). La peau et le muscle squelettique sont des cibles idéales pour ce type de technique vu leur accessibilité. Malgré les améliorations apportées ces dernières années, la mortalité cellulaire suite au choc électrique reste cependant un problème majeur.
- **les ultrasons** permettent également d'augmenter la perméabilité cellulaire aux macromolécules (Newman et al, 2001 ; Amabile et al, 2001).
- **l'injection hydrodynamique** quant à elle consiste à injecter rapidement un grand volume d'une solution d'ADN. Par exemple, 1.6 ml de solution saline pour une souris de 20 g ou 10 ml pour un rat. Cette technique permet dans les meilleurs cas de transfecter par exemple 50 % de myofibres après injection dans l'artère iliaque de rat (Herweijer et Wolff, 2003).
- **la biolistique** ou méthode « gene gun » est également facilement applicable à des tissus comme la peau. Des microbilles d'or, de tungstène ou de platine sont recouvertes d'ADN et sont propulsées dans le cytoplasme ou le noyau des cellules cibles à l'aide d'un canon à particules (Yang et al, 1990).

I.3.2 Les vecteurs synthétiques

Pour surmonter les inconvénients liés à l'utilisation de vecteurs viraux, ainsi que la faible efficacité de transfection avec l'ADN nu, des structures non-virales à base de motifs cationiques ont été envisagées. La raison principale ayant motivé l'emploi de structures cationiques est leur capacité de complexer et condenser l'ADN plasmidique par interactions entre les charges négatives des phosphates de l'ADN et les charges positives du vecteur, formant un complexe (vecteur + ADN) lui même chargé positivement. Cet excès de charges positives permet aux vecteurs d'interagir avec les charges négatives des glycoprotéines et glycolipides de la membrane plasmique. Ainsi, les complexes peuvent se fixer et pénétrer dans la cellule. Deux systèmes « historiques » ont marqué la naissance, dans les années 80, de cette stratégie : le diéthylaminoéthyl (DEAE)-dextran (Lopata et al, 1984) et le phosphate de calcium (Chen et al, 1987). Toutefois, les conditions imposées par les conditions opératoires ainsi que les rapports efficacité de transfection / toxicité limitent grandement l'intérêt *in vivo* de ces deux techniques.

Par la suite, l'élaboration et l'utilisation de vecteurs synthétiques à base de lipides ou de polymères cationiques ont permis de mettre en évidence leurs qualités multiples :

- la facilité et la fiabilité de production,
- leur biocompatibilité,
- leur capacité de vectoriser des séquences d'ADN de grande taille,
- leur souplesse d'utilisation. Par exemple, différents mélanges de lipides et/ou de polymères peuvent être utilisés pour obtenir une charge optimale et adapter la taille des vecteurs en fonction des voies d'administration ou des cellules cibles.

Depuis les 10 dernières années, de nombreux efforts ont été faits pour concevoir des vecteurs de synthèse en mimant les caractéristiques avantageuses des vecteurs viraux, afin d'améliorer leur efficacité de transfection (pour revue, voir Rittner ; 2002).

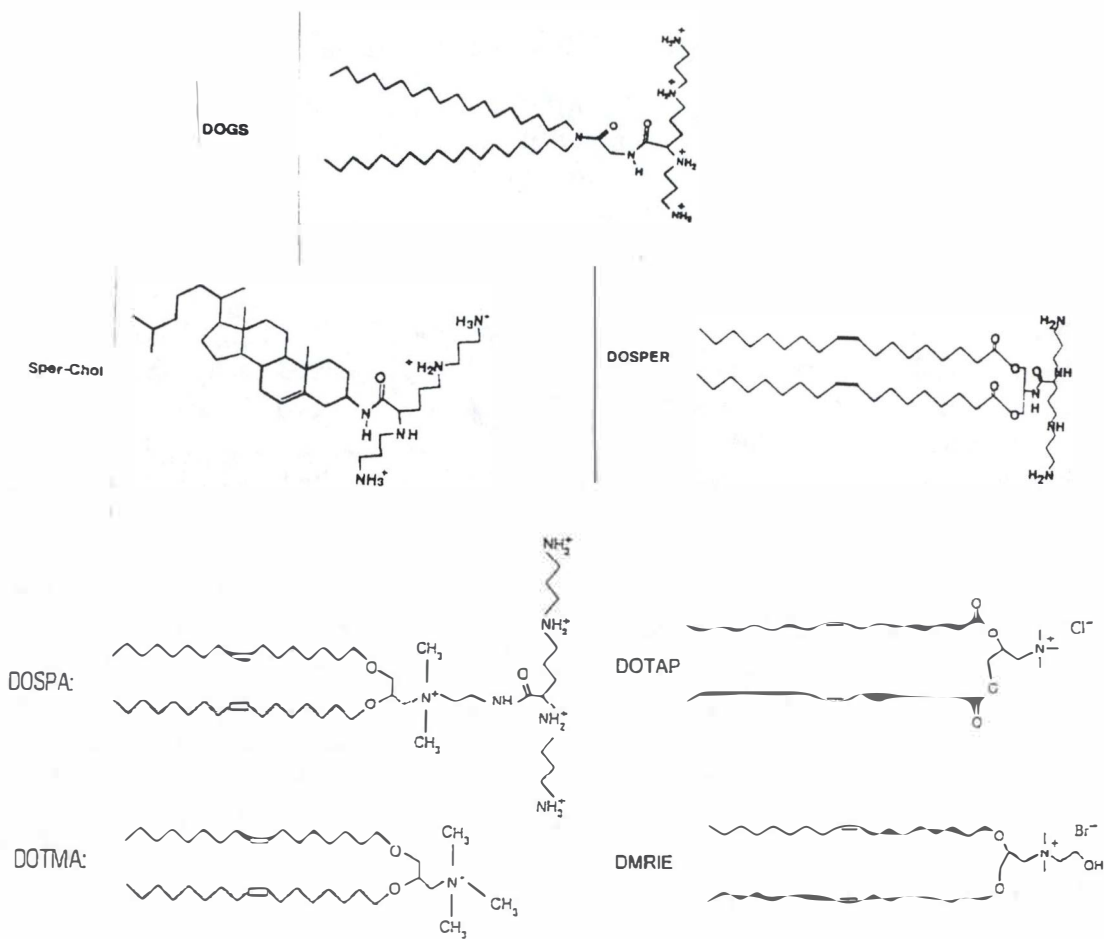


Figure I.2. Représentation de la structure chimique de quelques lipides cationiques utilisés comme vecteur de transfection.

DOGS : dioctadécyl amidoglycine spermine

Sper-chol : spermine-cholestérol

DOSPER : dioléoxyl oxy carboxy spermyl propylamide (4) acétate

DOSPA : trifluoroacétate de 2,3-dioléyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)éthyl]-N,N-diméthyl-1-propanaminium

DOTAP : chlorure de N-[1-1(2,3-dioléyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium

DOTMA : bromure de 2,3- dioléyloxypropyl-1 tri-méthylammonium

DMRIE : bromure de 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxyéthylammonium

(Laurent, 2001; Mumper et al, 1999).

En effet, comme nous le verrons dans le paragraphe I.4, les complexes injectés dans un organisme rencontrent de nombreuses barrières physiologiques sur leur trajet jusqu'au noyau des cellules cibles. Les virus sont mieux outillés que les vecteurs synthétiques pour outrepasser les barrières rencontrées. Cependant, ces vecteurs synthétiques peuvent être **fonctionnalisés** à la demande, et ce afin d'améliorer leur pouvoir transfectant. Les vecteurs synthétiques se divisent en 2 familles : les lipides cationiques et les polymères cationiques.

I.3.2.1 Les lipides cationiques

Le premier modèle de lipide cationique, la lipofectine, a été proposé dès 1987, en considérant que les lipides chargés positivement peuvent interagir avec l'ADN chargé négativement par interactions électrostatiques pour former des complexes lipides / ADN appelés **lipoplexes** (Felgner et al, 1987). Depuis leur première utilisation, les formulations à base de lipides cationiques seuls ou en combinaison avec des lipides neutres, n'ont cessé de se multiplier. Le lipide neutre comme par exemple, la dioléoyl phosphatidyl éthanolamine (DOPE) ou le cholestérol joue le rôle de lipide « helper ». Il facilite la libération cytosolique par déstabilisation de la membrane endosomale (Farhood et al, 1995). Le cholestérol stabilise également les liposomes en milieu ionique.

Voici quelques exemples de produits commercialisés (dont certains sont illustrés à la figure I.2), couramment utilisés pour transfecter des cellules en culture :

- le DOTAP : chlorure de N-[1-(2,3-dioléoyloxy) propyl]-N,N,N-triméthylammonium (Roche).
- le DMRIE : bromure de 1,2-dimyristoyloxypropyl-3-hydroxyéthylammonium (Invitrogen).
- la lipofectine : DOTMA (bromure de 2,3-dioléoyloxypropyl-1 tri-méthylammonium) + DOPE (dioléoyl phosphatidyl éthanolamine) (Invitrogen).
- la lipofectamine : DOSPA (trifluoroacétate de 2,3-dioléoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido) éthyl]-N,N-diméthyl-1-propanaminium) + DOPE (Invitrogen).

Bien que couramment utilisés *in vitro*, les principaux obstacles quant à l'utilisation des lipides cationiques *in vivo*, restent les réactions inflammatoires qu'ils induisent et leur faible efficacité de transfection. En effet, ils sont rapidement éliminés lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse et ils s'accumulent dans les poumons (Ishiwata et al, 2000).

I.3.2.2 Les polymères cationiques

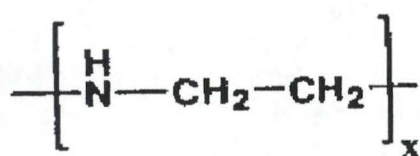
Les polymères synthétiques contiennent des fonctions amines, protonables responsables de leur caractère cationique dont la fonction première est de complexer l'ADN pour former des particules de 50 à 100 nm appelées **polyplexes** (Felgner et al, 1997).

Contrairement aux lipides cationiques, ils permettent de protéger plus efficacement les acides nucléiques de la dégradation par les nucléases, et d'augmenter l'entrée dans les cellules par voie d'endocytose (Nishikawa et Huang, 2001). Il est également possible d'y greffer divers peptides tels que des peptides fusio-gènes, des peptides de ciblage cellulaire ou nucléaire (ex : peptide NLS). Nous allons passer en revue les principaux polymères cationiques utilisés pour la vectorisation d'ADN, dont la structure est représentée à la figure I.3. Cette liste est loin d'être exhaustive.

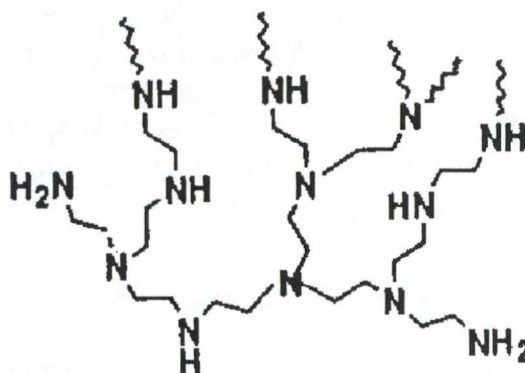
• Polypeptides

De nombreux auteurs se sont intéressés au rôle compactant que peuvent avoir des polymères d'acides aminés chargés positivement tels que les polymères à base de L-lysine, de L-arginine ou de L-histidine.

Polyéthylèneimine (PEI)

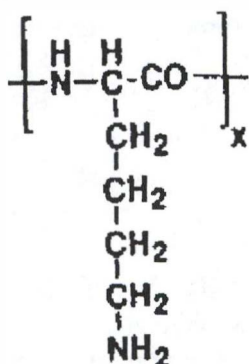


PEI linéaire

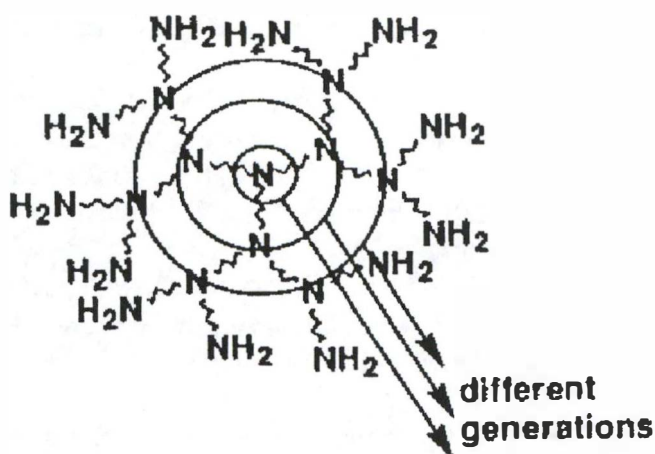


PEI branché

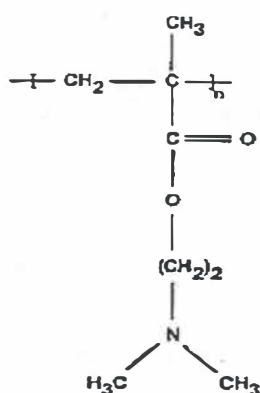
Poly-L-lysine (PLL)



Dendrimère polyamidoaminé (PAMAM)



Polymère de méthacrylate



P(MADAM)

Chitosan

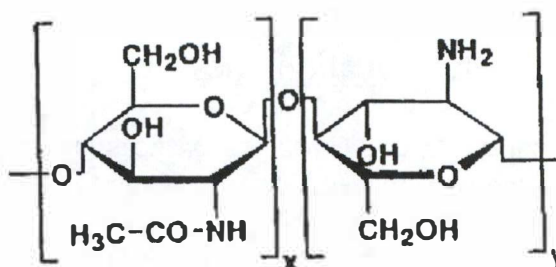


Figure I.3. Les polymères cationiques les plus fréquemment utilisés comme vecteur synthétique pour la transfection. De structure linéaire ou branchée (avec plusieurs degrés de branchement possibles), il s'agit en général de polyamines, éventuellement construites à partir d'acides aminés (PLL) ou de sucres (chitosan) (Merdan et al, 2002; Reschel et al, 2002).

Les polymères de L-lysine, sont les plus étudiés et la caractérisation de la liaison de la poly-L-lysine (PLL) à l'ADN a montré que celle-ci est dépendante du pH lorsque le rapport des charges (N/P) est inférieur à 0.8. De plus les PLL de haut poids moléculaire se lient plus efficacement à l'ADN (Read et al, 1999). Grâce à sa structure peptidique (figure I.3), la poly-L-lysine est biodégradable, une propriété souhaitable pour une application *in vivo*. Cependant, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence différentes interactions défavorables entre la PLL et les structures biologiques, notamment avec les membranes et le système du complément (Plank et al, 1996 ; Merdan et Kopecek, 2002).

Il a été montré que la substitution de PLL avec des résidus histidyl pour former des co-polymères de poly-(L-lysine-L-histidine) permet d'augmenter l'expression du transgène comparé à la PLL seule (Midoux et Monsigny, 1999). Des systèmes hybrides polymères / lipides sont également de bons agents de transfection. Des études ont montré qu'en présence de sérum, le co-polymère linéaire d'histidine et de lysine (HK) en combinaison avec des liposomes, rend la transfection 100 fois plus efficace par rapport aux complexes liposome / ADN (Chen et al, 2001). Les polymères HK branchés avec un grand pourcentage d'histidines sont encore plus efficaces. Dans ce cas, en combinaison avec des liposomes, en présence de sérum, l'expression de gène est augmentée de 400 fois comparée aux liposomes seuls.

• Les polyéthylèneimines

Les polyéthylèneimines (PEI) sont des polymères aminés à haute densité de charges positives, où une fonction amine est présente tous les trois groupements (Boussif et al, 1995). Grâce à leur structure (représentée à la figure I.3), les PEI ont un niveau de protonation global qui passe de 20 à 45 % quand le pH diminue de 7 à 5 (Suh et al, 1994). Fortement chargés en surface, ils sont capables de former des complexes même avec de larges molécules chargées négativement comme l'ADN, formant des particules sphériques d'environ 100 nm, couramment utilisées à la fois pour des applications *in vitro* et *in vivo* (Goula et al, 1998).

Les molécules de PEI sont commercialisées dans une large gamme de poids moléculaires (200 à 800 000 Da) sous forme linéaire ou branchée (figure I.3). Plusieurs études comparatives ont montré que le dérivé linéaire de faible poids moléculaire (22 kDa) est le PEI le plus efficace (Goula et al, 1998). Par contre les molécules de PEI branchées (25 ou 800 kDa) sont moins efficaces et plus toxiques (Wightman, 2001 ; Kircheis, 2001).

Les polymères de PEI font partie des agents de transfection non viraux les plus efficaces.

• Les dendrimères

Les dendrimères (« starburst ») sont des polymères de polyamidoamine (PAMAM). Ils ont une structure tridimensionnelle sphérique hyperbranchée (représentée à la figure I.3) et portent un grand nombre de fonctions amines, dont toutes ne sont pas protonées à pH physiologique (Esfand et Tomalia, 2001). Ces fonctions amines sont primaires en surface et tertiaires à l'intérieur. Les dendrimères, tout comme le PEI, sont des agents transfectants prometteurs. L'avantage est de pouvoir les synthétiser de manière contrôlée, leur donnant une structure plus ordonnée que le PEI et une taille précise. Le degré de branchement est exprimé en terme de « génération ». Les dérivés des 3 premières générations ne sont pas plus efficaces que le DEAE-dextran, notamment parce qu'il n'y a pas formation effective de complexes (Kukowska-Latallo et al, 1996). Par contre le passage aux générations suivantes, c'est-à-dire l'augmentation du nombre de groupements amines améliore fortement l'efficacité de transfection.

Par exemple, les générations de 5 à 7 sont environ 3000 fois plus efficaces que les agents transfectants témoins (DEAE-dextran et lipides cationiques) (Kukowska-Latallo et al, 1996). Les complexes à base de PAMAM sont stables, globalement, plus performants que les systèmes de lipides cationiques (Lipofectamine, Lipofectine), malgré une toxicité variable en fonction des lignées cellulaires.

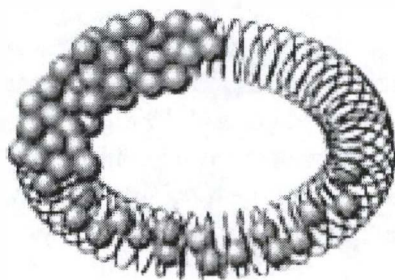


Figure I.4. Représentation schématique du modèle d'interaction du complexe SuperFect-ADN. Le SuperFect (les sphères) interagit avec l'ADN (spirale) pour former une structure en forme d'anneau (Qiagen)

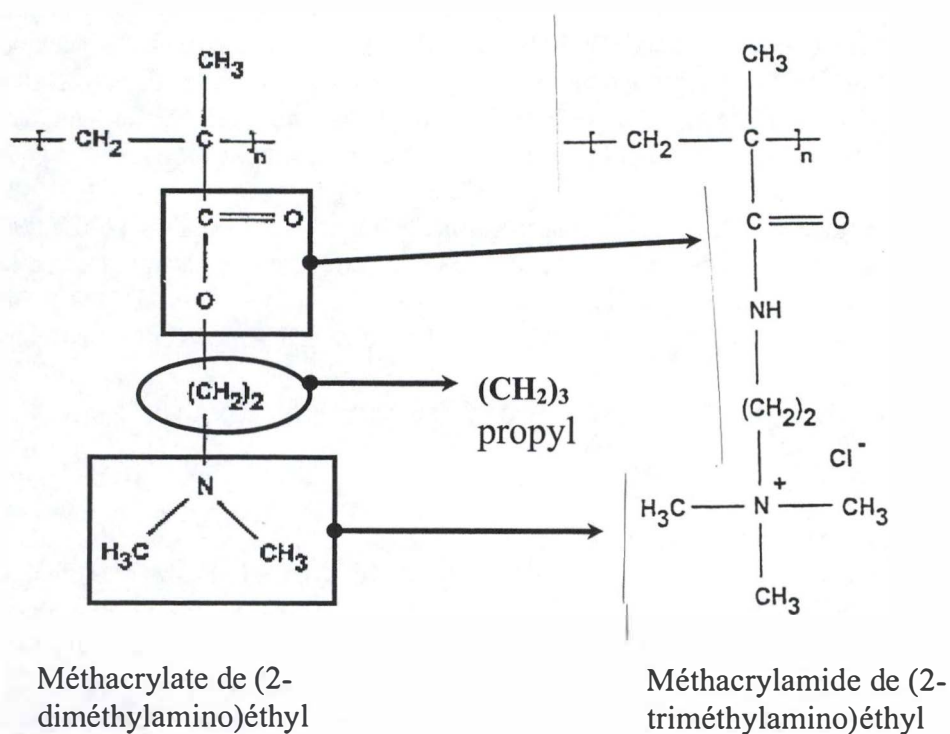


Figure I.5. Représentation des modifications possibles au niveau de la structure d'un polymère de méthacrylate. La liaison ester peut être remplacée par une liaison amide plus stable, le groupement éthyl peut être remplacé par un groupement propyl plus long et la quaternisation permet d'augmenter le nombre de groupements méthyl et donc les charges portées par ce vecteur synthétique.

Il existe deux sortes de dendrimères dits non activés ou activés. La différence est que les dendrimères activés par hydrolyse partielle possèdent moins d'amines tertiaires, ce qui leur donne plus de flexibilité. Le SuperFect (SF) est un exemple de dendrimère activé de 6^{ème} génération, qui possède deux bras de polymères à chaque point de branchement (Merdan et al, 2002). Il est fourni par la firme Qiagen selon laquelle, il interagit avec l'ADN pour former un complexe en forme d'anneau, comme représenté à la figure I.4.

• Les polymères de méthacrylate

Les polymères de méthacrylate, bien tolérés par l'organisme, sont déjà utilisés comme biomatériaux synthétiques de substitution dans le domaine de la chirurgie, par exemple en tant qu'implants ophtalmologiques (Chirila, 2001) et osseux (Heini et Berlemann, 2001), ou comme « drug carriers » (Kopecek et al, 2000).

En 1996, Chemg et ses collaborateurs proposent pour la première fois l'utilisation de poly(MADAM) ou poly(méthacrylate de (2-diméthylamino) éthyl) (représenté à la figure I.3), comme polymère polycationique pour vectoriser l'ADN (Chemg et al, 1996). Les avantages majeurs de ce type de polymère sont la facilité et le faible coût de synthèse, mais surtout la possibilité d'optimiser la structure, la composition, le poids moléculaire, la densité de charges, ainsi que d'y greffer diverses fonctions de manière bien contrôlée. En jouant à tous ces niveaux, de nombreux types de polymères dérivés d'une dorsale de méthacrylate ont pu être développés et utilisés en tant que vecteurs de transfection. Deux polymères de méthacrylate type sont illustrés à la figure I.5. Certains de ces polymères contiennent des liaisons esters, qui ont l'avantage d'être métabolisables, alors que d'autres contiennent des liaisons amides, plus stables, mais également plus toxiques. Le groupement éthyl peut également être remplacé par un groupement propyl afin d'éloigner la charge de la dorsale de méthacrylate. Les polymères peuvent être également quaternisés afin d'augmenter la densité de charges en surface. Plusieurs de ces polymères ont été testés en transfection sur des cellules 293. Les résultats suggèrent que les complexes formés à partir de polymères cationiques de haut poids moléculaire montrent souvent des taux d'expression du transgène plus élevés. De plus, les polymères contenant des amines quaternaires ont montré une complexation efficace de l'ADN, mais une efficacité de transfection 10-100 fois plus faible que celle observée pour la plupart des autres polymères cationiques (Wolfert et al, 1999).

• Les chitosans

Les chitosans sont des polysaccharides linéaires (figure I.3) dérivés de la chitine (poly-N-acétyl-D-glucosamine), principal constituant de la paroi des crustacés. En tant qu'agent naturel, biocompatible et biodégradable, ils sont utilisés à moindre coût dans le domaine biomédical pour toute forme de pansements (Chandy et Sharma, 1990). Citons par exemple, un système de peau artificielle, les fils de suture qui se résorbent naturellement après cicatrisation et les lentilles de contact. Enfin, les chitosans constituent un excellent support pour le transport et le relargage lent, de principes actifs médicamenteux, c'est-à-dire comme « drug carrier » (Illum et al, 1994). Non digérés par l'estomac, ils sont par exemple de bons retardateurs dans la délivrance de produits encapsulés, comme l'ADN, devant arriver sans transformation dans l'intestin.

Les fonctions amines primaires sont protonées à pH 6.5 et leur permettent d'interagir avec l'ADN. Contrairement aux lipides cationiques ou les PLL, les chitosans ont donc une densité de charges plus faible à pH physiologique, ce qui réduit considérablement leur toxicité (Chandy et Sharma, 1990).

Ils possèdent en outre des propriétés structurales similaires aux glycosaminoglycans (GAGs) que l'on retrouve sur de nombreux types cellulaires, et miment leurs fonctions (Chandy et Sharma, 1990). De ce fait, les chitosans peuvent être utilisés en tant qu'agent transfectant naturel, ayant des propriétés intrinsèques pour cibler certains tissus, tels que l'endothélium et l'épithélium.

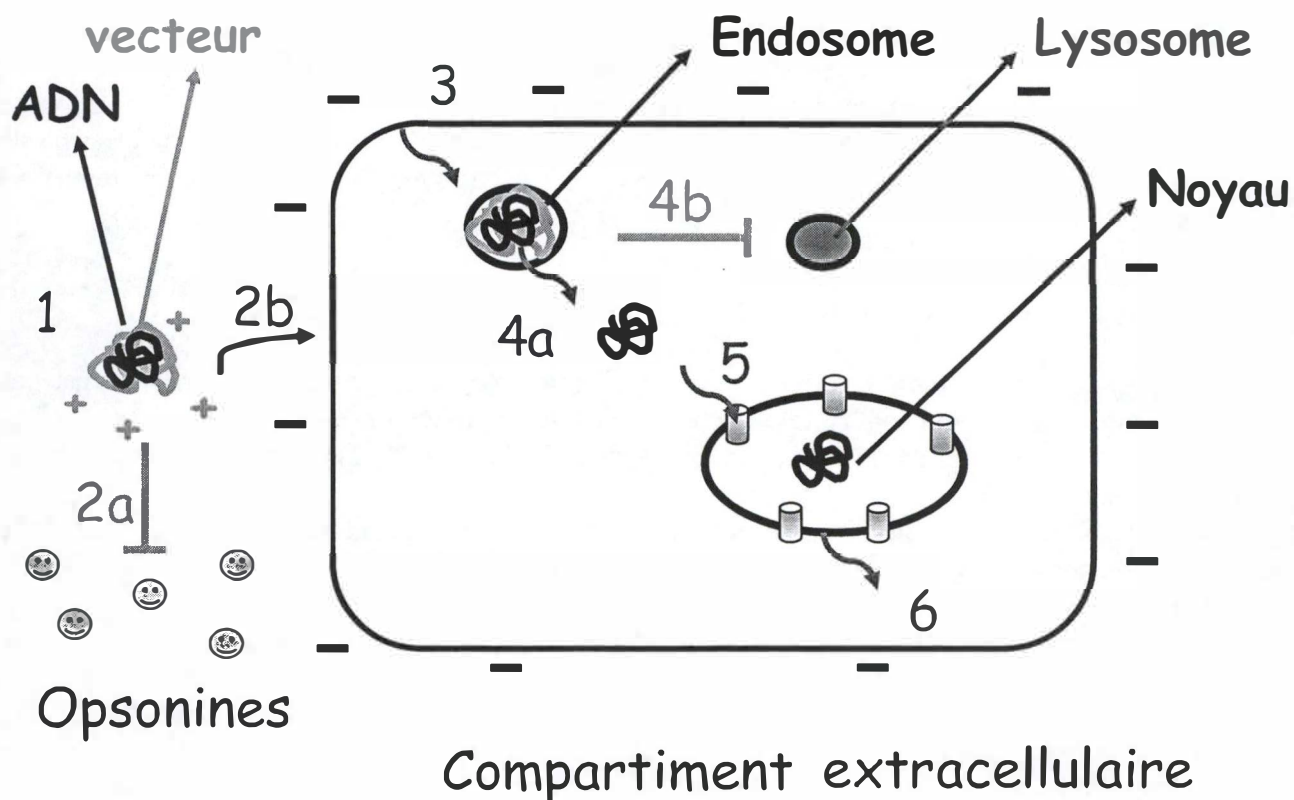


Figure I.6. Représentation schématique des différentes étapes du cheminement des complexes vecteurs/ADN lors de la transfection. Après formation (1), les complexes doivent éviter les interactions non spécifiques indésirables avec les composants du sang, lors d'une application *in vivo* (2a) pour pouvoir interagir avec la membrane plasmique des cellules cibles (2b) et entrer dans la cellule par endocytose (3). Une fois internalisés dans des vésicules d'endocytose, les complexes doivent sortir de l'endosome (4a) avant la fusion avec le lysosome (4b). Dans le cytoplasme, les complexes ou l'ADN dissocié sont soumis aux nucléases cytoplasmiques et doivent encore atteindre le noyau (5) afin *in fine* que le transgène soit exprimé, avec synthèse de la protéine (6).

A titre d'exemple, signalons que du chitosan galactosylé a été utilisé *in vitro* pour cibler des hépatocytes (Park et al, 2003).

En fonction du poids moléculaire et du degré d'acétylation, les chitosans forment des complexes de diamètre inférieur à 100 nm, qui sont stables, même en présence de sels et de sérum (Mac Laughlin et al, 1998) et fournissent une protection contre les DNases comparable à celle observée avec les PEIs (Koping-Hoggard, 2001). Ceci est un critère avantageux pour une application *in vivo* et leur efficacité de transfection *in vivo* semble assez importante. Une préparation particulière de complexes chitosan/ADNp encapsulés dans des microsphères d'alginate permet une application orale (Alexakis et al, 1995). Il a été observé que l'administration orale de ces particules provoque l'expression du transgène dans les cellules épithéliales de l'intestin *in vivo* (Roy et al, 1999). L'ensemble de ces avantages fait de ce système à base de sucres, un agent attrayant pour la transfection cellulaire, *in vitro*, mais aussi *in vivo*.

Après une phase initiale de développement intensif de nouveaux vecteurs, des études mécanistiques sont devenues une part essentielle de la recherche se focalisant sur la vectorisation de l'ADN.

En effet, l'efficacité de transfection des systèmes non viraux, peut être limitée par les nombreuses étapes que représente le transport du gène d'intérêt de l'espace extracellulaire jusqu'au noyau de la cellule cible. La connaissance de ces étapes est indispensable pour orienter efficacement la conception des vecteurs et développer des stratégies adaptées afin d'améliorer la transfection. Nous allons donc décrire les barrières rencontrées lors de la transfection, avant d'introduire les différentes stratégies développées afin de les surmonter.

I.4 La transfection : un processus multi-étapes qui se heurte à plusieurs barrières

La voie d'administration de l'ADN détermine le nombre de **barrières** qui doivent être surmontées par les vecteurs afin de véhiculer celui-ci avec succès. Par exemple, lorsque les tissus sont bombardés avec l'ADNp par la méthode du « gene gun » décrite au point I.3.1, l'ADN est directement délivré dans le cytoplasme ou même dans le noyau des cellules cibles (Yang et al, 1990). Par contre, lorsque l'ADN est déposé sur les cellules cibles lors des expériences *in vitro*, la première barrière rencontrée est la membrane plasmique. L'application *in vivo* par voie intraveineuse se heurte à des barrières physiologiques supplémentaires comme par exemple, les interactions non spécifiques avec les composants du sang et du système immunitaire. Dans l'organisme, la taille des complexes est un facteur déterminant qui influence le processus de distribution, tel que le passage à travers les capillaires (environ 5 µm) ou l'endothélium fenestré du rein (30-500 nm). La charge électrique des complexes affecte également leur biodistribution. Outre le fait qu'ils puissent interagir avec la membrane plasmique pour induire l'entrée cellulaire, les complexes sont préalablement soumis à de nombreuses interactions non spécifiques, avant d'atteindre les cellules cibles pouvant dans certains cas, conduire à leur élimination. De plus, l'efficacité d'expression du gène est dépendante de plusieurs facteurs intracellulaires additionnels à **l'entrée de l'ADN au sein des cellules cibles**, qui comprennent le **relargage des vésicules endocytaires**, la stabilité dans le **cytoplasme**, le ciblage et l'entrée dans le **noyau**. Nous allons passer en revue ces différents facteurs (figure I.6).

I.4.1 L'opsonisation et l'activation du complément

L'efficacité de transfection plus faible *in vivo* est due en partie à l'interaction des complexes avec les composants du sang (Escriou et al, 1998 ; Boussif et al, 1995). En effet, les complexes administrés par voie intraveineuse sont reconnus comme un matériel étranger et sont phagocytés par les cellules du système immunitaire, principalement les cellules de Kupffer dans le foie et les macrophages de la rate. L'opsonisation ou le recouvrement des complexes cationiques par les protéines spécifiques du sérum, appelées opsonines, induit également leur rapide élimination par les cellules phagocytaires du système réticulo-endothélial (RES) (Yang et Huang, 1997 ; Zou et al, 2000). En outre, l'adsorption de protéines chargées négativement neutralise les charges positives des complexes et augmente leur taille par agrégation, ce qui affecte significativement l'expression du transgène (Li et al, 1999). De plus, les différents types cellulaires rencontrés, tels que des macrophages, monocytes, neutrophiles, plaquettes et érythrocytes sont d'importants médiateurs de la toxicité (Tousignant et al, 2000 ; McLean et al, 1997). Les manifestations toxiques induites par les complexes peuvent varier d'une agglutination de globules rouges (Ogris et al, 1999) jusqu'à une puissante réaction inflammatoire et une élévation du niveau d'enzymes hépatiques dans le sérum (Li et al, 1999). Généralement, les polycations sont moins immunogènes que les adénovirus (Ferkol et al, 1996) cependant, l'activation du système non spécifique reste un problème majeur. En effet, à cause de leur taille et du grand nombre de charges cationiques, les polymères tels que les PLL, les dendrimères et les PEIs activent rapidement le système du complément (Planck et al, 1996). L'endothélium pulmonaire possédant des récepteurs pour le complément, ce tissu se trouverait ciblé par des complexes opsonisés (Planck et al, 1996). Il a été démontré que l'interaction de l'albumine avec les polyplexes entraîne la formation de complexes ternaires, avec une charge en surface inversée, ce qui a pour effet de former de larges agrégats (Verbaan et al, 2001). Ces associations de complexes sont rapidement éliminées dans le flux sanguin, via la capture par les récepteurs scavengers des phagocytes du foie ou par leur accumulation dans les lits de fins capillaires.

I.4.2 L'internalisation dans la cellule

Les complexes chargés positivement interagissent également de manière non spécifique avec les charges négatives de la membrane, notamment celles des glycoprotéines et glycolipides situés en surface de toutes les cellules (Mislick et Baldeschwider, 1996 ; Belting et Petersson, 1999). Il est dès lors difficile de cibler un type cellulaire précis comme le nécessite souvent la thérapie génique.

De nombreux travaux suggèrent que les complexes sont internalisés par endocytose. Ce processus est également dépendant de la taille des complexes (Zhou et Huang, 1994). Zhou et Huang ont montré en 1994, que les agents pharmacologiques connus pour interférer avec les voies endocytaires inhibent la transfection. Parallèlement, des études en microscopie électronique confirment ces résultats biochimiques. Elles permettent en effet de visualiser des complexes de PLL/ADN dans les vésicules de la voie endocytair (Zhou et Huang, 1994). Des expériences plus récentes de microscopie électronique et de cytométrie de flux, utilisant un marqueur vital de la membrane plasmique (FM4-64) et des complexes PEI/ADN marqués pour transfecter les cellules L929, ont montré que les complexes suivent une voie d'endocytose classique en phase fluide. Ils sont internalisés efficacement dans les endosomes en moins de 10 min, si leur taille ne dépasse pas 200 nm de diamètre (Rémy-Kristensen et al, 2001). En plus d'être dépendant du type cellulaire, le mode d'entrée de l'ADN dans la cellule peut dépendre aussi de la nature du vecteur. Par exemple, l'endocytose peut être le mode majeur pour l'entrée des complexes lipides cationiques/ADN (Zabner et al, 1995), mais l'entrée via une disruption directe de la membrane cellulaire est aussi possible (Zhou et Huang, 1994).

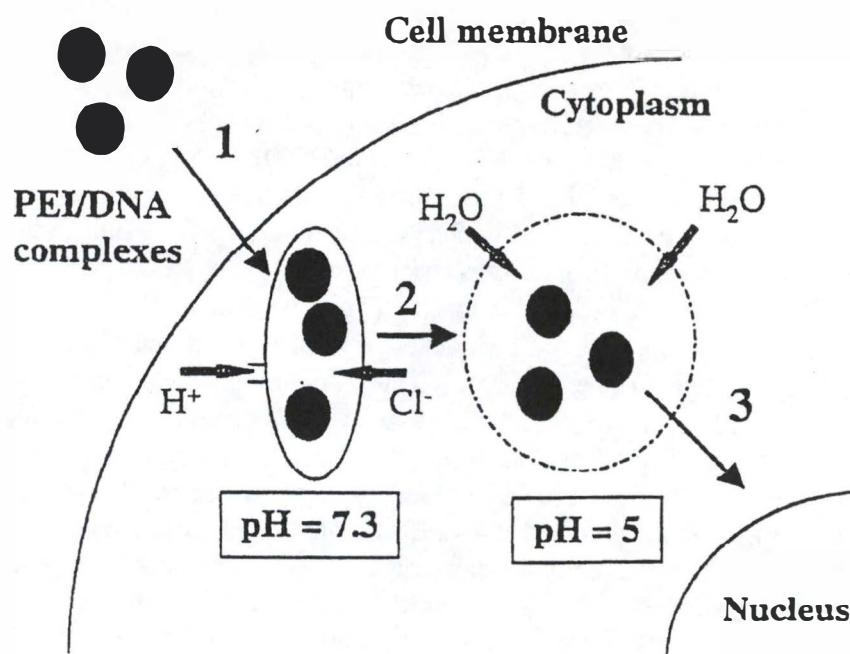


Figure I.7. Représentation schématique de l'effet « éponge à protons » des complexes cationiques après endocytose. Les complexes PEI/ADN sont internalisés par endocytose (1). La capacité tampon du polymère induit une augmentation de l'entrée de protons et d'ions chlorure pour assurer l'acidification de l'endosome, suivie d'un influx d'eau dans la vésicule (2). La pression osmotique entraîne le gonflement et la rupture de l'endosome, permettant aux complexes PEI/ADN d'atteindre le cytoplasme (3) (Kichler et al, 2001).

I.4.3 La sortie de l'endosome

La séquestration des complexes dans les endosomes ou les lysosomes peut constituer une seconde barrière membranaire majeure limitant l'efficacité de transfection. La faible efficacité de transfection associée aux PLL par exemple, est le résultat de l'incapacité de ce vecteur à faire sortir les polyplexes de l'endosome avant la fusion avec les lysosomes. Certains vecteurs sont mieux outillés que d'autres pour assurer cette sortie de l'endosome, comme par exemple les PEI. L'hypothèse émise pour expliquer la propriété endosomolytique intrinsèque des PEI est celle de l'« **éponge à protons** » ; proposée par Behr et ses collaborateurs (Boussif et al, 1995) (illustrée à la figure I.7). Elle propose que les polymères, comme les PEI, qui contiennent un grand nombre de groupements basiques (généralement des amines) partiellement protonés à pH physiologique, peuvent prévenir l'acidification des vésicules d'endocytose en séquestrant les protons activement transportés par les pompes à protons vacuolaires (V-ATPases). Vu que le pH est tamponné par le polymère, l'ATPase continue de transporter des protons, accompagnés d'ions chlorure dans la vésicule. L'augmentation de la concentration d'ions dans celle-ci est suivie par un influx massif d'eau, qui entraîne un gonflement osmotique et par conséquent la disruption de l'endosome, facilitant la sortie des complexes dans le cytosol. L'effet « éponge à protons » implique une quantité minimum de PEI présent dans l'endosome pour permettre une rupture efficace de l'endosome (Kichler et al, 2001). Les dendrimères et les polymères ou méthacrylates portent également un grand nombre de fonctions amines, partiellement protonées à pH physiologique. Les deux types de polycations sont capables de faire sortir les complexes des compartiments endosomaux via un mécanisme « éponge à proton » (Merdan et al, 2002). Bien qu'appartenant aux groupes des lipides cationiques, certains dérivés à charges positives multiples, le DOGS par exemple (figure I.2), possèderaient également ce pouvoir tampon. Ainsi la présence de DOPE n'est pas nécessaire pour permettre à des complexes DOGS/ADN de s'échapper des endosomes et d'éviter la dégradation lysosomiale (Labat-Moleur et al, 1996).

En supposant que les complexes s'échappent des endosomes avant de subir l'action hydrolytique des lysosomes, ces complexes (ou l'ADN) doivent encore être transportés à travers le cytoplasme vers le noyau.

I.4.4 Le transport à travers le cytoplasme

Le cytoplasme est un fluide très visqueux dans lequel la diffusion des macromolécules est très lente (Luby-Phelps et al, 1987). Les complexes de plus de 54 nm sont pratiquement immobiles à moins d'être transportés activement par les réseaux de microtubules et microfilaments, comme c'est le cas pour les organelles et autres structures colloïdales (Hamm-Alvarez, 1998).

Une question reste toujours débattue : où se dissocient les complexes vecteur/ADN ? L'hypothèse la plus répandue est que cette dissociation se ferait dans le cytoplasme, avant l'entrée de l'ADN dans le noyau. Dans ce cas, la mobilité de l'ADN est fortement dépendante de sa taille et les plasmides de plus de 2000 paires de bases (pb) apparaissent immobiles, alors que des fragments jusqu'à 500 pb diffusent librement du cytoplasme jusqu'au noyau, après microinjection (Lukacs et al, 2000). De plus, l'ADN est instable dans le cytoplasme. Lechardeur et ses collaborateurs ont rapporté que l'ADNp microinjecté est rapidement dégradé, probablement par les nucléases cytoplasmiques. Le temps de demi-vie de l'ADN nu est apparemment de 50 à 90 min dans le cytoplasme des cellules HeLa et Cos-7 (Lechardeur et al, 1999).

I.4.5 L'entrée dans le noyau

Si l'entrée des complexes dans les cellules cibles, leur sortie de l'endosome et le transport cytoplasmique de l'ADN, sont des obstacles qu'il faut surmonter, l'import nucléaire du transgène constitue aussi clairement une barrière limitante pour la vectorisation non virale. Une question importante reste en suspens : comment l'ADN exogène (tel que l'ADN plasmidique) ou les complexes non dissociés, sont-ils importés dans le noyau ?

Dans un premier travail, Capecchi a montré que les plasmides microinjectés dans le cytoplasme de cellules en culture, sont très faiblement exprimés, alors que ceux microinjectés dans le noyau sont hautement exprimés. Ces données qui suggèrent que l'enveloppe nucléaire est une barrière majeure pour le transport nucléaire d'ADNp (Capecchi et al, 1980). Les complexes ou l'ADN entreraient dans le noyau, soit par les pores nucléaires de diamètre très petit, soit lors de la mitose lorsque la membrane nucléaire se désintègre. Cela suppose que les cellules soient en division active, ce qui n'est pas toujours le cas, particulièrement lors d'une application *in vivo*. En effet pour la lipofection, il a été décrit que des niveaux d'expression élevés du gène rapporteur étaient uniquement obtenus dans les cellules en division active (Zabner et al, 1995 ; Tseng et al, 1999). Pour la polyfection par contre, les résultats sont moins clairs. La division cellulaire n'est pas une condition absolue pour l'entrée dans le noyau. Brunner et ses collaborateurs ont montré que l'efficacité de transfection des vecteurs lipidiques et polymères (incluant les PEI branchés) avec des cellules en phase S (synthèse) ou G2 (avant la mitose) est 30 à 500 fois plus élevée qu'avec des cellules en phase G1 (fin de mitose) (Brunner et al, 2000), ce qui suggère que la transfection est dans ce cas dépendante du cycle cellulaire. Par contre avec les PEI linéaires, ils ont observé de faibles différences dans l'expression du transgène entre les cellules transfectées en G1 et celles transfectées en S/G2 (Brunner et al, 2002). Excepté pendant la mitose, où l'enveloppe nucléaire est désintégrée, la seule voie possible pour l'entrée de macromolécules est le passage à travers le complexe des pores nucléaires (NPC) que nous détaillerons plus loin.

En résumé, pour obtenir une transfection efficace *in vitro*, les complexes doivent traverser un processus multi-étapes qui inclut :

- l'interaction avec la membrane plasmique,
- l'internalisation dans la cellule,
- la sortie de l'endosome avant la fusion avec le lysosome,
- le transport cytoplasmique,
- l'entrée dans le noyau.

In fine le transgène est transcrit et l'ARNm traduit en protéine.

L'application *in vivo* (nous nous limiterons à la voie intraveineuse) comporte des barrières extracellulaires additionnelles telles que :

- l'opsonisation et l'activation du complément,
- le problème du ciblage d'un tissu ou type cellulaire spécifique.

Nous allons à présent détailler les stratégies développées ces dernières années pour surmonter ces barrières, dans le but d'améliorer l'efficacité de transfection des vecteurs. Nous nous focaliserons principalement sur les modifications apportées aux polymères, étant donné que c'est la classe de vecteurs qui nous intéresse.

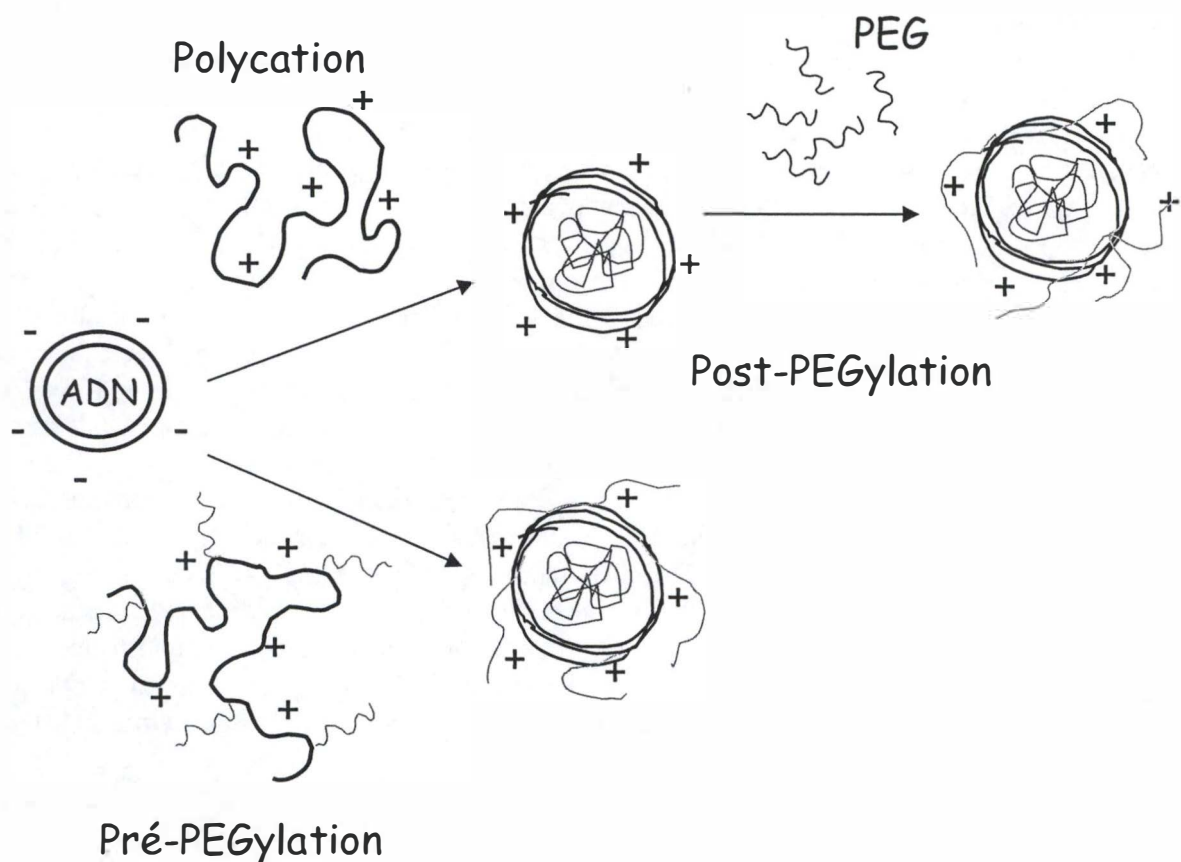


Figure I.8. Représentation schématique des stratégies de PEGylation. La **post-PEGylation** correspond au greffage d'une molécule hydrophile, le polyéthylène glycol (PEG) sur les groupements aminés libres du polycation, **après** complexation avec l'ADN. La **pré-PEGylation** consiste à ajouter le PEG au polycation pour former un copolymère **avant** la formation des complexes. La PEGylation permet de masquer les charges positives portées par le polycation et de former de ce fait une barrière hydrophile en surface des complexes.

I.5 Amélioration des vecteurs synthétiques

Pour un transfert d'ADN efficace *in vivo*, le système de vectorisation utilisé doit favoriser le ciblage vers les cellules et tissus cibles, l'entrée cellulaire et le cheminement intracellulaire jusqu'au noyau. Les premières difficultés rencontrées viennent du compartiment sanguin.

I.5.1 La PEGylation

Comme nous l'avons vu précédemment, l'efficacité de transfection plus faible *in vivo* est due en partie à l'interaction des complexes avec les composants du sang qui inhibe la transfection (Escρίου et al, 1998 ; Boussif et al, 1995) (point I.4.1).

Il est possible d'éviter les interactions défavorables avec les composants du sang en incluant du poly(éthylèneglycol) aussi appelé poly(oxyde d'éthylène) (PEG ou PEO) en surface des complexes (Ogris et al, 1999 ; Kircheis et al, 2001 ; Simoes et al, 1999). Le PEG est un polymère linéaire, hydrophile, non chargé qui est non immunogène et non toxique (Montaguti et al, 1994 ; Hjortkjaer et al, 1999).

La modification covalente des protéines et enzymes avec du PEG fonctionnalisé a été intensément étudiée depuis les années 1970 (Delgado et al, 1992). Plus de 40 protéines thérapeutiques, modifiées par PEGylation, ont montré une amélioration de l'efficacité thérapeutique avec une augmentation de la solubilité et du « temps de demie-vie » dans la circulation, ainsi qu'une réduction de l'immunogénicité. La PEGylation des protéines de capsides d'adénovirus a également été réalisée permettant d'augmenter la stabilité des protéines et d'empêcher la réponse immune humorale induite contre elles, ce qui se traduit par une augmentation du taux de transfection (O'Riordan et al, 1999).

Dans le cas des polymères, le greffage de polymères hydrophiles aux complexes, masquant les charges cationiques de surface, permet de créer une barrière stérique contre l'agrégation avec par exemple l'albumine, les facteurs du complément et les composants cellulaires du sang (Merdan et al, 2002).

Deux stratégies générales de PEGylation ont été développées et sont illustrées à la figure I.8. La première consiste à former initialement les complexes polymère/ADN et de greffer par la suite du PEG sur les groupements amines libres (post-PEGylation) (Ogris et al, 1999). La seconde est basée sur la formation de copolymères à partir de polymères cationiques et de PEG (pré-PEGylation) (Kwoh et al, 1999 ; Toncheva et al, 1998). Il a été démontré que de petites particules avec une taille d'environ 100 nm et une charge en surface proche de la neutralité, peuvent être obtenues avec les deux stratégies (Nguyen et al, 2000). Nguyen et ses collaborateurs ont synthétisé une série de copolymères, en greffant au PEI différentes molécules hydrophiles non chargées, telles que des chaînes de PEO, de polyéthers ou de Pluronic 123 (c'est-à-dire PEO-PPO-PEO où PPO signifie polyoxyde de propylène) (Nguyen et al, 2000). Ces copolymères permettent de former des complexes avec l'ADN qui sont stables en milieu aqueux, ainsi que dans une variété de solutions couramment employées en transfection, avec ou sans sérum (Nguyen et al, 2000). Cependant, l'efficacité de transfection de ces systèmes est plus faible que celle du PEI (25 kDa) non modifié ou celle du SuperFect, dans les cellules Cos-7. Des copolymères formés de polymères de MADAM et de PEG ont permis également d'augmenter la stabilité et la solubilité des complexes.

La formation d'une barrière hydrophile par le PEG, permet de réduire l'agrégation des complexes, ce qui est démontré par la formation de complexes plus petits et plus homogènes par comparaison à ceux formés à partir des homopolymères (Rungsardthong et al, 2001). Ces copolymères à base de PEG montrent cependant une plus faible efficacité de transfection que les homopolymères MADAM.

L'incorporation de PEG en surface des complexes formés à partir de PLL permet aussi de réduire la cytotoxicité des complexes et de maintenir le niveau d'expression du transgène jusqu'à 96 h. Dans ce cas, cette méthode permet une transfection de 5 à 30 fois plus efficace que la PLL seule, lors d'une expérience réalisée sur des cellules cancéreuses (Choi et al, 1998). La post-modification des complexes PLL/ADN a également été réalisée avec un polymère synthétique de N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide p(HPMA) et semble une alternative prometteuse pour l'utilisation *in vivo* (Read et al, 1999; Dash et al, 2000).

Les polymères p(HPMA) présentent des propriétés versatiles, comme vecteur polymérique pour une large variété de médicaments, avec une excellente biocompatibilité (Kopecek et al, 2000). Ce groupe de polymères hydrophiles représente un excellent candidat pour masquer la charge des complexes.

En résumé, l'ajout de polymères hydrophiles masquant les charges positives des complexes a comme effets bénéfiques:

- ✓ d'éviter les interactions non spécifiques avec les composants du sang,
- ✓ d'augmenter la solubilité des complexes,
- ✓ d'augmenter le temps de circulation des complexes dans le sang,
- ✓ d'augmenter la stabilité des complexes,
- ✓ de prévenir l'aggrégation érythrocytaire,
- ✓ de réduire la toxicité des complexes.

I.5.2 Le ciblage cellulaire

Les stratégies utilisées pour augmenter la spécificité de l'internalisation des complexes peuvent être classées selon 2 approches:

I.5.2.1 Un ciblage passif

Les complexes et macromolécules peuvent s'accumuler passivement dans les tumeurs et les zones d'inflammation, à cause de l'augmentation de la perméabilité de l'endothélium ou un manque de drainage lymphatique en connection avec une hypervascularisation des tissus. Cet effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) favorise la capture des complexes et est exploité avec succès pour cibler les tumeurs sans avoir recours à des ligands spécifiques (Shiah et al, 1999). L'accumulation dépend également de la taille et de la charge des complexes. Il a été démontré que les lipoplexes cationiques s'accumulent dans les régions de prolifération angiogénique, principalement via des interactions électrostatiques (Thurston et al, 1998) et cet effet peut être aussi bien appliqué aux polyplexes.

I.5.2.2 Un ciblage actif

Le but de cette approche est d'ajouter sur le polycation un ligand spécifique d'un récepteur membranaire, favorisant ainsi l'endocytose des complexes ligand-récepteur. Il existe de nombreux ligands qui peuvent être greffés de manière covalente ou non.

Les plus fréquemment utilisés sont :

- **les asialoglycoprotéines** : le premier polymère synthétique utilisé, la PLL, a déjà été couplé de manière covalente à une asialoglycoprotéine pour le ciblage d'hépatocytes. Les hépatocytes sont des cellules porteuses d'un nombre très élevé de récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPr), d'où la spécificité de ce système pour le foie.

- **le folate** : le récepteur au folate représente un ligand intéressant pour cibler les cellules cancéreuses, qui surexpriment souvent ce récepteur (pour revue, voir Lu et Low , 2002).
- **les facteurs de croissance** : les récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou au FGF (Fibroblast growth Factor) sont des cibles exploitables dans la thérapie génique contre le cancer. Ils sont surexprimés dans de nombreux tissus cancéreux, tels que les cancers du poumon, cerveau, vessie, foie et sein. Récemment, en couplant l'EGF de manière covalente à du PEI, on a pu augmenter de 300 fois l'expression d'un transgène au sein de 3 lignées tumorales testées, en comparaison au polymère non modifié (Blessing et al, 2001). Les mêmes observations ont été faites avec des conjugués de PLL-EGF (Cristiano et Roth, 1996) ou de PLL-FGF (Sosnowski et al, 1996).
- **des anticorps spécifiques** : plusieurs types d'anticorps ou leurs fragments ont été greffés aux polyplexes par différentes stratégies de conjugaison pour permettre un ciblage préférentiel de types cellulaires spécifiques. Cependant, un désavantage potentiel de cette stratégie *in vivo* est le risque d'induire une réponse immune lors d'administrations répétées. Le poids moléculaire élevé des anticorps peut également affecter la taille et la stabilité des complexes (Merdan et al, 2002).

I.5.3 Le relargage de l'endosome

L'internalisation des complexes par endocytose pose plusieurs problèmes associés à ce mode de transport, tel que leur séquestration dans les compartiments endocytaires et leur dégradation enzymatique.

Comme nous l'avons déjà mentionné, certains polymères sont mieux armés que d'autres pour faire sortir les polyplexes de l'endosome, car ils ont un pouvoir tampon puissant (PEI, dendrimères), ce qui n'est pas le cas des PLL. Les complexes PLL/ADN ont une structure leur permettant d'être endocytés, mais ces particules n'ont pas la possibilité de s'échapper activement des endosomes avant d'atteindre les lysosomes, d'où une efficacité de transfection relativement faible. Les PLL requièrent donc l'aide d'**agents endosomolytiques** tel que la chloroquine (Zenke et al, 1990 ; Erbacher et al, 1996), le glycérol (Zauner et al, 1996) ou des peptides fusiogènes qui déstabilisent la membrane des vésicules acides contenant les polyplexes (Midoux et al, 1993 ; Wagner et al, 1992 ; Midoux et al, 1998), afin d'améliorer l'efficacité de transfection.

La capacité bien connue de la **chloroquine** d'augmenter l'efficacité de transfection des PLL a été expliquée par son pouvoir tampon (Wagner, 1998) : la chloroquine est une base faible qui capte les protons lors de l'acidification de l'endosome et cette neutralisation favorise le relargage des polyplexes vers le cytoplasme évitant donc la dégradation de l'ADN dans les lysosomes.

Une autre stratégie, déjà mentionnée, est l'incorporation dans les polymères de PLL de résidus histidyl. Midoux et Monsigny ont montré que ces copolymères ont un pouvoir transfectant supérieur à celui des homopolymères de PLL, même en absence d'agents déstabilisant les membranes (Midoux et Monsigny, 1999). Le **groupement imidazole de l'histidine** a un pKa de 6.0, et donc se protone à pH acide et facilite probablement le relargage des complexes de l'endosome par un mécanisme « éponge à protons », comme décrit au point I.4.3 (Merdan et Kopecek, 2002) et illustré à la figure I.7.

Toujours dans le but de favoriser la libération endosomale des complexes, le greffage de **peptides fusiogènes** sur le polymère cationique a également été envisagé. Le peptide INF1, correspondant à la partie N-terminale de la sous-unité de l'hémagglutinine (HA-2) du virus de la grippe (Haemophilus influenza), possède une séquence qui, après diminution du pH jusqu'à 5-6, est capable de former une hélice amphiphile, déstabilisant la membrane endosomale (Lear et Degrado, 1987). Par couplage de ce peptide, l'efficacité des PLL est multipliée par 1000 (Plank et al, 1994). Divers peptides amphiphiles synthétiques ont été utilisés dans la formulation de vecteurs d'ADN, tels que les peptides JTS1, GALA ou KALA (Wagner et al, 1999).

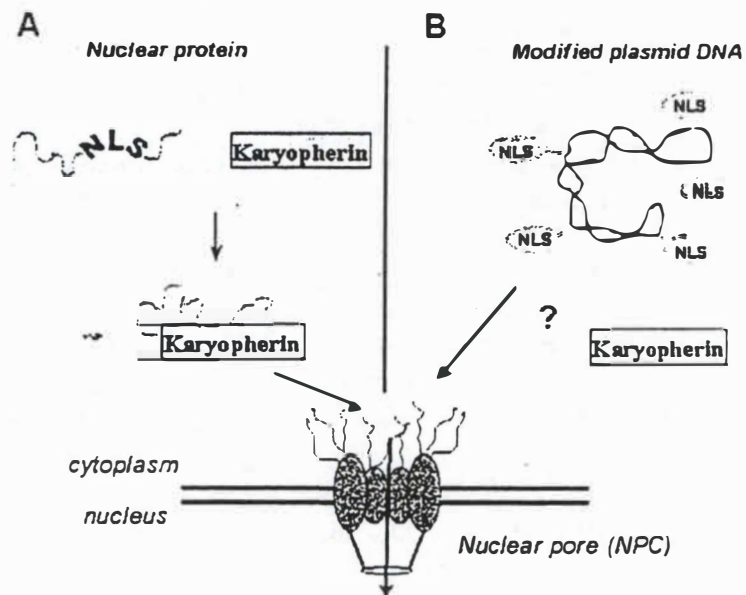


Figure I.9 L'import nucléaire de protéines et de plasmides modifiés avec des NLS. (A) Les protéines nucléaires se lient aux importines par leur séquence NLS (Nuclear Localisation Sequence). Ce complexe subit une translocation dans le noyau. (B) Par analogie avec les protéines nucléaires, l'ADN peut être modifié afin d'exposer des séquences NLS et être reconnu par les importines (Escriou et al, 2003).

Ces peptides fonctionnent de la même manière que le peptide INF1 ; par la formation d'une hélice- α amphiphile capable d'interagir avec les lipides membranaires pour former des pores (Merdan et al, 2002). Récemment, deux peptides fusiogènes (ppTG1 et ppTG20), ont été exploités pour la première fois comme unique composant de vecteur de transfection *in vivo* et ont permis une expression du transgène dans les poumons d'animaux vivants, après injection intraveineuse (Rittner et al, 2002).

Une nouvelle approche prometteuse utilise les domaines de transduction des protéines virales, tels que celui de la protéine TAT du virus HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus type-1). Ces protéines sont capables de médier l'entrée des complexes directement dans le cytoplasme sans utiliser les mécanismes endocytaires, ce qui permet d'outrepasser l'obstacle des vésicules endocytaires (Merdan et al, 2002).

I.5.4 Le transport dans le cytoplasme

Dans le cytoplasme, l'ADN peut être dégradé et sa mobilité est limitée (Lukacs et al, 2000). Cependant, certains vecteurs comme les PEI semblent protéger l'ADN de la dégradation et faciliter son transport vers le noyau (Bieber et al, 2002). Contrairement aux lipides cationiques, Pollard et ses collaborateurs ont montré que l'ADN complexé à du PEI branché, permet d'augmenter l'expression du transgène quand les complexes sont microinjectés dans le cytoplasme de cellules en culture par rapport à de l'ADN nu (Pollard et al, 1998). D'autre part, il a été rapporté que le PEI endocyté (administré avec ou sans ADN) subit une translocation dans le noyau (Godbey et al, 1999). Le cyblage vers le noyau semble être plus efficace avec les PEIs de plus petites tailles (Pollard et al, 1998). De plus, la microinjection de polyplexes directement dans le noyau n'affecte pas l'efficacité de transfection, et donc la transcription de l'ADN, à la différence des lipoplexes (Pollard et al, 1998). Ce qui suggère que la dissociation polymère/ADN pourrait être intra-nucléaire et non cytoplasmique. D'autres résultats ont montré que l'ADN peut être transcrit même si il est fortement complexé au PEI, ce qui indique que la désintégration des complexes dans le noyau n'est pas nécessaire (Bieber et al, 2002).

I.5.5 L'entrée dans le noyau

Le transport des polyplexes à travers la membrane nucléaire peut être une autre barrière importante pour une transfection efficace.

Comme nous l'avons vu précédemment, contrairement aux cellules qui ne se divisent plus, la membrane nucléaire des cellules en division constante se désintègre lors de chaque mitose et permet le transfert passif d'ADN transfecté. Pour les méthodes qui révèlent une efficacité de transfection fortement dépendante du cycle cellulaire, l'incorporation de peptides de ciblage nucléaire a été tentée. En effet, dans ce cas, la seule voie possible pour l'entrée de macromolécules est le passage à travers le complexe des pores nucléaires (NPC). La structure exacte du NPC varie selon le type cellulaire. Il est constitué typiquement de plus de 50 protéines différentes appelées nucléoporines et de filaments cytoplasmiques et nucléaires associés, formant un pore central.

Il permet la diffusion passive de petites molécules (jusqu'à 9 nm de diamètre ou des protéines jusqu'à 50 kDa) ou le transport actif de molécules de plus grande taille (jusqu'à 25 nm de diamètre ou d'environ 1000 kDa). Le mécanisme de transport nucléaire de macromolécules (protéines, RNAs et RNPs ou ribonucléoprotéines) est un processus consommant de l'énergie et médié par un transporteur. Les protéines nucléaires, qui sont par définition destinées au noyau, portent une ou plusieurs séquences signal de ciblage nucléaire appelées NLS (Nuclear Localisation Sequence) (Imamoto et al, 2000), dont la plus connue est celle de l'Antigène T du virus SV 40 (PKKKRKV). En fonction des protéines importées, une ou plusieurs protéine(s) de transport cytoplasmique appelées importines, s'associent avec la séquence NLS pour former un complexe ciblant le pore nucléaire (figure I.9). La translocation dans le nucléoplasme est un processus actif impliquant l'hydrolyse de GTP.

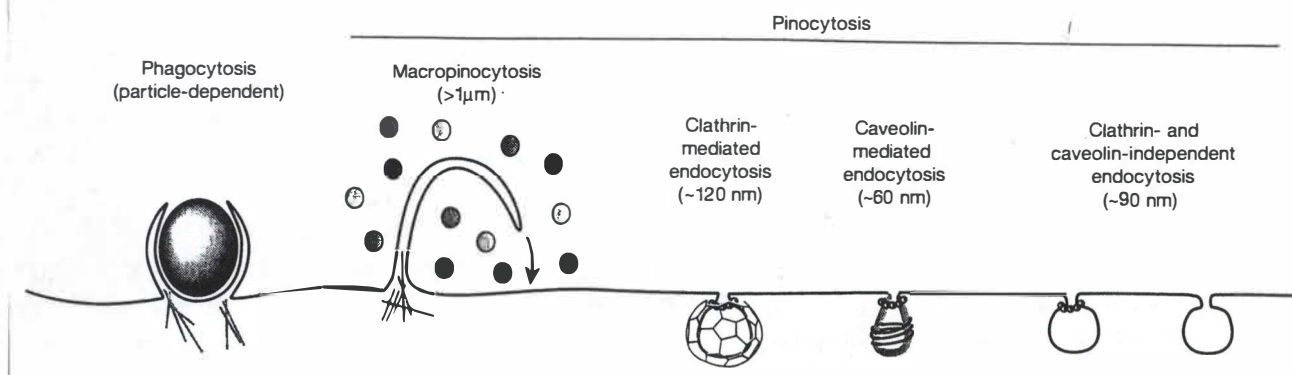


Figure I.10. Représentation schématique des multiples possibilités d'entrée de matériel extracellulaire dans la cellule. Les voies d'endocytose diffèrent entre elles par la taille des vésicules formées, la nature des molécules cargos (ligands, récepteurs et lipides) et les mécanismes de formation des vésicules (Conner et Schmid, 2003).

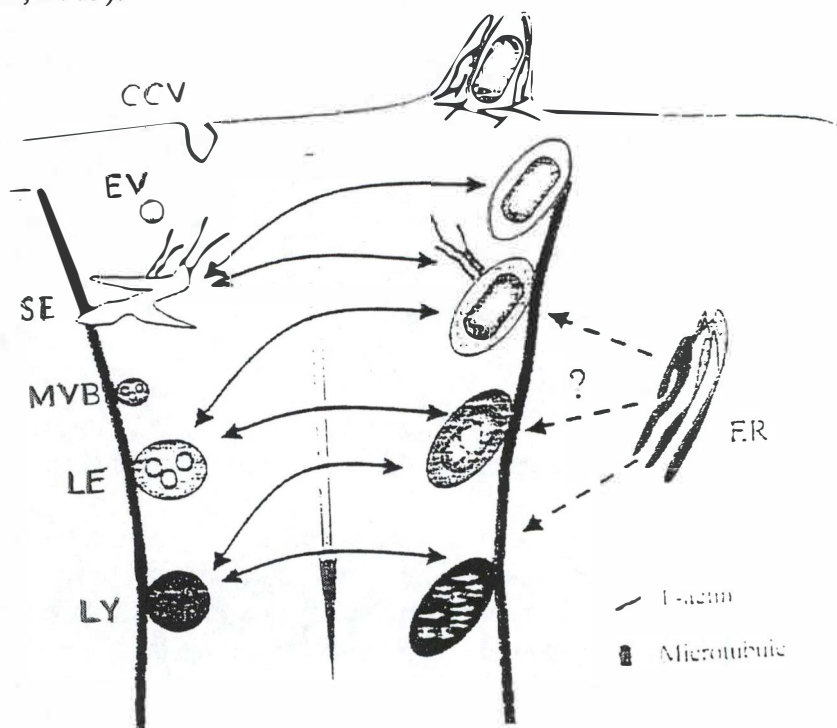


Figure I.11. Schéma illustrant le parallélisme entre la progression de l'endosome au lysosome et la maturation du phagosome en phagolysosome. Les interactions des phagosomes avec les compartiments de la voie endosomale sont indiquées par les flèches. Une interaction possible avec le réticulum endoplasmique (ER) est aussi notée. CCV (vésicule tapissée de clathrine) ; EV (vésicule d'endocytose) ; SE (endosome précoce) ; LE (endosome tardif) ; LY (lysosome) ; MVB (corps multivesiculaire). (Gruenberg, 2001).

Celui-ci n'a pas encore été totalement élucidé, mais il consiste probablement en une série d'étapes de dissociation/réassociation des complexes transportés avec les nucléoporines (Escρίου et al, 2003).

Différentes stratégies ont été développées pour modifier l'ADN avec un signal de ciblage nucléaire, telle que l'association par interactions électrostatiques avec des peptides dérivés de l'antigène T du virus SV40 (Collas et al, 1996). Certains auteurs ajoutent un large excès de NLS par plasmide (Subramanian et al, 1999), d'autres rapportent une importation active avec environ 100 NLS par plasmide (Sebestyén et al, 1998), alors que d'autres ne greffent qu'un NLS par plasmide (Ludtke et al, 1999 ; Zanta et al, 1999). Zanta et ses collaborateurs ont montré que la transfection est augmentée d'un facteur 1000 dans les cellules 3T3 avec une seule séquence NLS. Mais la controverse sur l'efficacité d'un ou plusieurs NLS subsiste (Escρίου et al, 2003).

D'autres séquences riches en arginine, telles que celles des protéines TAT et REV dérivées du HIV-1, n'agissent pas seulement comme domaines de transduction protéique, permettant aux complexes d'entrer dans la cellule par une voie indépendante de l'endocytose (point I.5.3), mais peuvent aussi augmenter l'entrée nucléaire (Truant et al, 1999).

Dans le prochain paragraphe, nous décrivons les grands mécanismes relatifs aux différents types d'endocytose. Nous tenterons de comprendre également les modèles actuels qui essayent d'éclairer et de comprendre les mécanismes du trafic intracellulaire s'établissant entre les différents compartiments cellulaires impliqués dans ce processus.

I.6 Internalisation des polyplexes et voies d'endocytose

Les cellules peuvent internaliser des substances, particules...présentes dans le milieu extracellulaire, soit par pinocytose, soit par phagocytose (pour une revue, voir Conner et Schmid, 2003). La **phagocytose** est restreinte à des types cellulaires spécialisés tels que les monocytes, macrophages et neutrophiles polymorphonucléaires et vise l'internalisation de particules de grande taille, qu'il s'agisse de bactéries, levures, débris cellulaires, etc... C'est un processus actif dépendant de l'actine et faisant intervenir des récepteurs membranaires.

La **pinocytose**, essentielle pour l'entrée de nutriments, l'autorégulation des récepteurs de surface et le maintien de l'homéostasie (Trowbridge et al, 1993), se déroule dans tous les types cellulaires et via au moins 4 mécanismes (pour une revue, voir Conner et Schmid, 2003) (figure I.10).

- la macropinocytose,
- l'endocytose médiée par la clathrine,
- l'endocytose médiée par les cavéoles (CME),
- l'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles.

Enfin, on classe également la pinocytose en

- endocytose en phase fluide, pour les molécules présentes dans le milieu extracellulaire, et qui ne sont pas prises en charges par la membrane plasmique,
- endocytose adsorptive, pour les molécules se liant de manière non spécifique à la membrane plasmique,
- endocytose récepteur-dépendante, pour les molécules se liant de manière spécifique à un récepteur dit cargo. C'est le cas de l'endocytose médiée par la clathrine.

Lorsqu'on transfecte des cellules avec des complexes polymères/ADN, ceux-ci sont internalisés par phagocytose ou par pinocytose. Nous allons donc rapidement passer en revue ces différents mécanismes (représentés à la figure I.10), et voir quels sont ceux qui s'appliquent à l'internalisation des polyplexes.

I.6.1 La phagocytose

La **phagocytose** est une forme particulière **d'endocytose médiée par des récepteurs**, destinée à l'internalisation de larges particules, telles que des microorganismes ou des cellules mortes via des vésicules appelées phagosomes, de diamètre généralement supérieur à 250 nm (figure I.10). Un grand nombre de types cellulaires eucaryotes sont capables de phagocyter, mais leur efficacité de phagocytose varie fortement (Vieira et al, 2002). Il a été montré que la capacité de phagocytose des phagocytes non professionnels, tel que les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) ou les cellules Cos (cellules épithéliales de reins de singe), est augmentée par l'expression de récepteurs spécialisés aux fragments Fc γ des immunoglobulines (Fc γ Rs) que l'on ne trouve normalement que sur les neutrophiles ou macrophages (Caron et al, 1998 ; Nagarajan et al, 1995). La phagocytose est initiée par l'interaction de récepteurs de surface avec les ligands reconnus. Ces ligands peuvent être des composants endogènes de la particule (lipopolysaccharides (LPS), phosphatidylsérine) ou des opsonines recouvrant la surface des particules, telles que le fragment C3bi du système du complément ou l'immunoglobuline IgG (Kwiatkowska and Sobota, 1999; Vieira et al, 2002). Les particules opsonisées par le fragment C3bi sont reconnues par le récepteur du complément 3 (CR3; aussi nommé CD11b/CD18 ou Mac-1), un membre de la superfamille des intégrines, alors que les particules opsonisées par IgG engagent les récepteurs Fc γ Rs. La liaison aux récepteurs entraîne l'internalisation de la particule dans un phagosome par des séquences complexes d'événements qui requièrent des GTPases de la famille Rho, l'activation de kinases, la modification du métabolisme des phospholipides, le remodelage du cytosquelette d'actine et l'accélération du trafic membranaire (Aderem et Underhill, 1999 ; Sansonetti, 2000).

L'interaction récepteur-ligand induit une augmentation de la polymérisation d'actine près de la membrane, formant un pseudopode qui entoure la particule (Araki al, 1996). Immédiatement après sa formation, le phagosome subit d'énormes changements dans sa composition, ils sont dûs à un processus progressif de maturation qui conduit à une organelle hybride, le phagolysosome (Pitt et al, 1992). Celui-ci possède des propriétés dégradatives, telles qu'un pH acide et des enzymes hydrolytiques provenant des lysosomes. Le processus de maturation qui donne au phagosome une activité lytique dépend de l'interaction de la vacuole naissante avec la voie endocytaire. En effet, comme représenté à la figure I.11, il existe des analogies et des interactions entre le trafic endosomal et le processus de maturation des phagosomes (Desjardins et al, 1994). C'est pourquoi on retrouve également des phagosomes appelés précoces/tardifs qui aboutissent aux phagolysosomes.

I.6.2 La macropinocytose

La **macropinocytose** généralement considérée comme un mécanisme d'internalisation non spécifique, correspond à la formation de grandes vésicules hétérogènes (1 à 5 μ m) ou macropinosomes, représentés à la figure I.10. Bien que la macropinocytose semble être un processus constitutif dans les cellules dendritiques (Bar-Sagi et Feramisco, 1986 ; Veithen et al, 1996), dans la plupart des autres cellules, c'est une réponse transitoire induite par les facteurs de croissance ou les agents mitogènes (Swanson, 1989; Racoosin et Swanson, 1992). Tout comme la phagocytose, les cascades d'activation qui impliquent les GTPases de la famille Rho, responsables de la formation des protrusions membranaires dépendants de l'actine. Cependant ces protrusions membranaires ne ressemblent pas au système de « fermeture éclair » qui se produit pour les particules opsonisées associées aux récepteurs, lors de la phagocytose, mais fusionnent avec la membrane plasmique (Conner et Schmid, 2003). Cette voie d'endocytose semble être dépendante de la phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), indispensable au remodelage du cytosquelette d'actine qui produit le "ruffling" et les protrusions membranaires (Rupper et al, 2001).

I.6.3 Les voies de pinocytose dépendantes de la clathrine

La clathrine est la protéine structurale majeure des structures membranaires spécialisées appelées les puits tapissés de clathrine (clathrin-coated pits, CCP), qui sont responsables de l'internalisation des molécules dans cette voie de transport. Les CCP, de 100 à 150 nm, concentrent les récepteurs transmembranaires, en cours d'internalisation et s'invaginent jusqu'à l'obtention d'une vésicule (clathrin-coated vesicles, CCV) (Brodsky et al, 2001) (figure I.10). La voie dépendante de la clathrine est la forme la plus connue d'**endocytose médiée par des récepteurs** et ceux-ci sont classés en deux groupes. Certains récepteurs, comme le récepteur de la transferrine ou des LDL (Low Density Lipoproteins) sont internalisés de façon "constitutive" et se réinsèrent dans la membrane plasmique. D'autres, principalement les récepteurs aux facteurs de croissance, tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou l'insuline, ne sont internalisés qu'après la liaison de leur ligand et sont dégradés dans les lysosomes. Cette voie est également responsable de 40-50 % de l'**endocytose en phase fluide** (c'est-à-dire non relayée par des récepteurs) appelée **micropinocytose**.

La formation des vésicules tapissées fait intervenir les complexes AP, la clathrine et la dynamine, qui sont les protéines clés de cette étape initiale. Les complexes AP stimulent l'autoassemblage des molécules de clathrine : recrutés en premier, ils font le lien entre la membrane plasmique, les récepteurs et la clathrine, d'où leur nom d'adaptateurs ou d'adaptines. Ils permettent le recrutement sélectif et la concentration des récepteurs transmembranaires dans les CCP et par conséquent l'internalisation de ceux-ci. La dynamine est une GTPase intervenant dans les événements de fission membranaire aboutissant à la formation de la vésicule (Schmid et al, 1998 ; Sweitzer et Hinshaw, 1998). Les vésicules sont alors débarassées de ce manteau protéique avant de fusionner avec les endosomes précoces. Les étapes suivantes sont décrites au point I.6.6.

Cette voie d'internalisation s'applique aux polyplexes modifiés tels que décrits au point I.5.2. Dans ce cas, les polyplexes comportent un ligand qui se fixe sur son récepteur spécifique, favorisant la pinocytose récepteur-dépendante. Les ligands les plus utilisés jusqu'à présent sont la transferrine, les asialoglycoprotéines ainsi que les facteurs de croissance.

I.6.4 L'endocytose dépendante des cavéoles

L'**endocytose médiée par des cavéoles**, probablement régulées par des récepteurs cargo, implique l'invagination de la membrane plasmique formant des structures de 50 à 85 nm de diamètre, distinctes et plus petites que les puits recouverts de clathrine, elles sont appelées cavéoles (Rothberg et al, 1992). La protéine membranaire cavéoline, aussi nommée VIP21 (Kurzchalia et al, 1992), est un composant du manteau cytoplasmique (Dupree et al, 1993), nécessaire et suffisante pour la génération de nouvelles cavéoles. Ce manteau est probablement responsable de l'induction d'une force de courbure de la membrane plasmique permettant le bourgeonnement des cavéoles. Ces structures existent dans de nombreux types cellulaires tels que les cellules des muscles lisses, les cellules endothéliales, les fibroblastes..., mais leurs fonctions sont difficiles à décrire. Un rôle probable dans le transfert de petites molécules directement dans le cytoplasme, ou potocytose, a été décrit (Anderson et al, 1992). D'autres auteurs ont émis l'hypothèse d'un rôle dans la transduction du signal (Anderson 1993a,b ; Lisanti et al, 1994) et l'homéostasie du calcium (Schnitzer et al, 1995). L'endocytose dépendante des cavéoles dépend également de la dynamine et des microfilaments. Il est intéressant de noter que les cavéoles internalisent activement des lipides spécifiques (glycosphingolipides), des protéines et des ligands associés pour les séquestrer à travers un processus d'endocytose (Lamaze et Schmid, 1995 ; Parton et Simon, 1995).

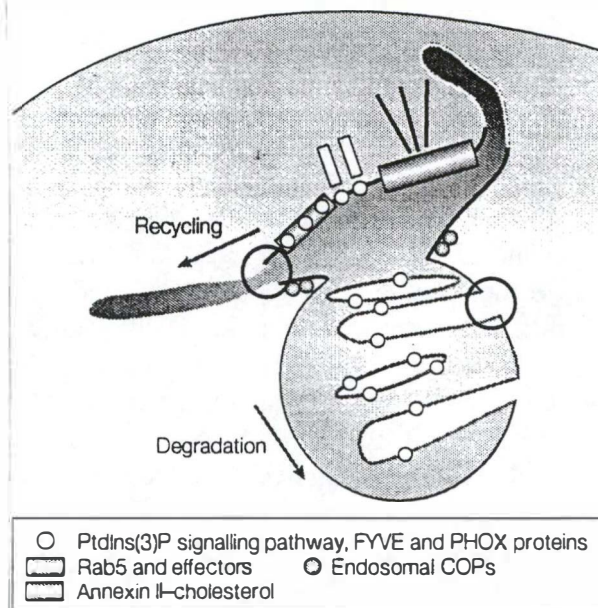


Figure I.12. Représentation schématique de l'endosome précoce, des microdomaines lipides-protéines et des machineries moléculaires associés. Les tubules guident les particules internalisées vers les endosomes de recyclage et la membrane plasmique, alors que la partie vésiculaire dirige les particules destinées à la dégradation vers les endosomes tardifs. Les phosphoinositides PI(3)P sont représentés par les petites sphères dans les régions de constriction ou d'invagination membranaire probablement impliquées dans la formation de vésicules « carrier » endosomales ou de corps multivésiculaires (MVB/ECV) (Gruenberg, 2001).

Ce processus d'internalisation par les cavéoles se produit cependant 4 fois moins rapidement que l'endocytose dépendante de la clathrine (Fishman, 1982). Les cavéoles jouent donc probablement un rôle limité dans l'endocytose en phase fluide.

I.6.5 L'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles

Lorsque l'assemblage de la clathrine est bloqué par certains agents pharmacologiques, l'entrée de marqueurs mesurant l'endocytose totale (comme par exemple, la peroxydase du raifort (HRP)) ne se trouve réduite que de 50 %, suggérant que l'endocytose dépendante de la clathrine ne contribue qu'à la moitié des entrées totales dans la cellule (Lamaze et Schmid, 1995). De plus, des mutants de la dynamine ont permis de montrer que **l'endocytose en phase fluide** est stimulée en réponse à l'inhibition de la voie clathrine (Damke et al, 1995). Hansen et ses collaborateurs ont décrit des vésicules préendosomales non tapissées de clathrine (95 nm de diamètre), qui continuent à se former sous des conditions qui inhibent la formation des vésicules tapissées, en l'occurrence une déplétion en potassium (Hansen et al, 1993). Ce processus serait également associé à la **micropinocytose adsorptive**, processus fonctionnant sans récepteurs où l'entrée des particules se réalise par interactions électrostatiques ou hydrophobes non spécifiques avec la membrane plasmique. En général, pour les polyplexes, la plupart des auteurs s'accordent à dire que la voie d'internalisation majoritaire serait l'endocytose en phase fluide ou adsorptive (Wattiaux et al, 2000 ; Merdan et al, 2002), l'une ou l'autre étant favorisée en fonction du type cellulaire (Merdan et al, 2002).

Enfin, on ne peut exclure que les cellules exprimant des récepteurs scavengers (macrophages, hépatocytes,...) puissent lier l'ADN via ces récepteurs, qui ont une affinité non négligeable pour les polyanions (Wattiaux et al, 2000).

I.6.6 Le trajet endocytaire: un chemin complexe

Une fois formées, les **vésicules d'endocytose** (EV) sont ciblées vers les endosomes de tri, aussi appelés **endosomes précoces** (SE). Ces vésicules sont équipées pour organiser et réorienter le cheminement des molécules internalisées. Elles ont une structure pléiomorphe constituée de citernes, d'où émergent des tubules d'environ 60 nm de diamètre et de larges vésicules de 300-400 nm (Gruenberg, 2001). Comme illustré à la figure I.12, les protéines et lipides membranaires de ces différentes structures définissent des microdomaines responsables des fonctions des endosomes. La partie tubulaire guiderait les particules internalisées vers les **endosomes de recyclage** et la membrane plasmique, alors que la partie vésiculaire dirigerait les particules destinées à la dégradation vers les **endosomes tardifs** (LE).

Deux hypothèses coexistent pour expliquer comment le trafic des endosomes précoces aux endosomes tardifs se déroule (Vieira et al, 2002) : le modèle de vésicule navette et le modèle de maturation. D'après le modèle de vésicule navette, les endosomes précoces sont des organelles stables, à partir desquelles des transporteurs intermédiaires, ou **corps multivésiculaires** (MVB), sont dérivés et par la suite ciblés vers les endosomes tardifs. Le modèle de maturation propose que les endosomes précoces sont des organelles transitoires qui mûrissent en MVBs via une série d'événements de fusion/fission pauvrement caractérisée, générant finalement des endosomes tardifs (Thilo et al, 1995 ; Gu et Gruenberg, 1999). Indépendamment du mécanisme précis menant à la création des endosomes tardifs, on admet généralement que les **lysosomes** (LY) sont l'étape finale du chemin endocytaire.

Le chemin endocytaire est donc organisé comme un continuum d'organelles allant des endosomes précoces aux lysosomes (figure I.11). Différents domaines membranaires, qui montrent des propriétés biophysiques définies, coexistent probablement dans chaque compartiment d'endocytose.

Organelles	Marqueurs moléculaires	pH
Endosome précoce ; phagosome précoce.	EEA1, Rab5, PI(3)P, syntaxine 13, récepteur à la transferrine, VAMP-3.	≈6.0
Endosome tardif ; phagosome tardif.	Rab7, Rab9, récepteur au mannose 6-phosphate, syntaxine 7, LAMPs, acide lysobiphosphatidique, PIP3.	5.5-6.0
Lysosome ; phagolysosome.	LAMPs, cathepsine D mature, marqueurs de phase fluide	4.5-5.5

Tableau I.2. Tableau reprenant les principaux marqueurs moléculaires des vésicules d'endocytose et de phagocytose (Vieira et al, 2002).

Protéine	Organelle
Rab1	réticulum endoplasmique et Golgi
Rab2	réseau Cis-Golgi
Rab3A	vésicules synaptiques, granules de sécrétion
Rab4	endosomes précoces
Rab5A	membrane plasmique, vésicules tapissées de clathrine
Rab5C	endosomes précoces
Rab6	citernes de la partie médiane du Golgi et trans-Golgi
Rab7	endosomes tardifs
Rab8	vésicules de sécrétion
Rab9	endosomes tardifs, réseau trans-Golgi

Tableau I.3 Tableau reprenant les protéines Rab les plus communes et leur localisation subcellulaire spécifique (Alberts et al, 2002).

L'interaction dynamique entre ces domaines fournit une force motrice qui est responsable à la fois de l'organisation spécifique de chaque compartiment et du mouvement des molécules cargo (Gruenberg, 2001 ; Pfeffer, 2003). En effet, les voies d'endocytose qui ont été détaillées et le trafic membranaire sous-jacent semblent être plus ou moins régulés :

- par le pH,
- par la nature des molécules cargo et leurs récepteurs,
- par la production et l'accumulation des phosphoinositides en membrane,
- par le squelette d'actine.

Un événement clé dans la maturation des vésicules endocytaires est l'**acidification progressive** de la lumière, à partir d'un pH proche de la neutralité jusqu'à un pH inférieur à 5 (Vergne et al, 1998). L'acidification phagosomale, tout comme celle des endosomes et lysosomes, est régulée par les complexes d'ATPases vacuolaires (V-ATPase) (Tapper et Sundler, 1995). Il est évident que le pH des organelles a un rôle important dans le trafic membranaire. Donc, la dissipation de ce gradient de pH par ajout d'antagonistes de la V-ATPase retarde le transfert du matériel internalisé des endosomes précoces jusqu'aux endosomes tardifs et lysosomes, et cause la tubulation de l'endosome (van Deurs et al, 1996; D'Arrigo et al, 1997). Le mécanisme sous-jacent n'est pas encore élucidé.

Les différentes vésicules se distinguent à divers niveaux comme représenté dans le tableau I.2.

Les vésicules d'**endosomes précoces** contiennent des protéines spécifiques comme Rab5 qui sont des petites GTP-ase ou EEA1 (Early Endosome Antigen) qui est un effecteur de Rab5 (Vieira et al, 2002). La lumière des endosomes précoces est relativement pauvre en protéases et légèrement acide ($\text{pH} \pm 6$). Les **endosomes tardifs** sont plus acides ($\text{pH} = 5.5$), et sont enrichis en enzymes hydrolytiques. Ils peuvent être identifiés par leur nature multivésiculaire et par la présence de Rab7, Rab9, le récepteur au mannose-6-phosphate ainsi que des protéines membranaires associées aux lysosomes (LAMPs) (Mukherjee et al, 1997 ; Somsel Rodman et Wandinger-Ness, 2000). Ces organelles contiennent la majeure partie des protéases et lipases actives et sont extrêmement acides ($\text{pH} \leq 5$).

Les lysosomes contiennent les LAMPs et des enzymes hydrolytiques comme la cathepsine D, bien qu'il soit clair actuellement qu'on puisse également trouver ces protéines au niveau des endosomes tardifs. Peu de choses sont connues sur la composition des corps multivésiculaires (MVB). Par analogie, les phagosomes précoces contiennent les protéines EEA1 et Rab5; les phagosomes tardifs contiennent les mêmes protéines que les endosomes tardifs (Rab7, Rab9, etc...).

Ces protéines spécifiques pourront être exploitées pour suivre le cheminement intracellulaire des polyplexes, en combinant de l'immunocytochimie et la microscopie confocale.

La progression le long de la voie endocytaire se fait par un système de fusion/fission. Les phénomènes de fusion sont médiés par l'interaction de différentes protéines et lipides des vésicules d'endocytose et du cytosquelette (Gruenberg, 2001 ; Pfeffer, 2003).

Par exemple, au niveau des endosomes précoces, le PI(3)P (phosphatidylinositol 3-phosphate) aurait un rôle de recrutement de EEA1 en se liant au domaine riche en cystéine de la protéine, avec une grande affinité et spécificité (Patki et al, 1997; Gaullier et al, 1998). EEA1 contient également deux sites de liaison à Rab5, pouvant de ce fait rapprocher deux membranes d'endosomes précoces contenant Rab5 (Simonsen et al, 1998 ; Callaghan et al, 1999). Donc EEA1 semble être un effecteur crucial de Rab5, fournissant un lien fonctionnel entre les protéines Rab et les SNAREs qui régulent la fusion membranaire (McBride et al, 1999).

Les protéines Rab font partie d'une grande famille de GTPases monomériques qui confèrent la spécificité du transport vésiculaire. Les plus communes sont présentées dans le tableau I.3 et sont insérées spécifiquement à la face cytosolique de la vésicule correspondante.

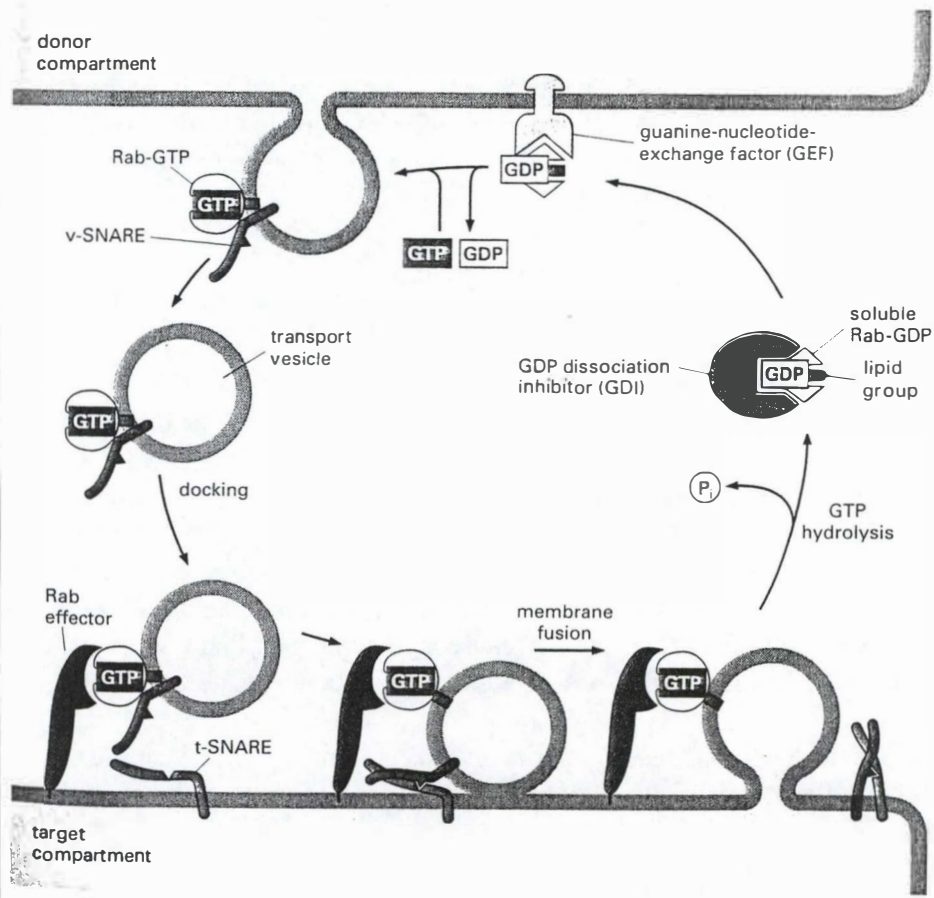


Figure I.13. Représentation schématique des mécanismes de transport vésiculaire et de fusion membranaire avec les compartiments cibles. Rab-GTP provenant de la membrane du compartiment donneur, reste lié à la face cytoplasmique des vésicules transportées. Il interagit ensuite avec son effecteur situé en membrane du compartiment receveur. Les protéines Rab et leur effecteur facilitent le transport ciblé et la liaison appropriée entre v-SNARE et t-SNARE. Après fusion de la vésicule avec la membrane cible, la protéine Rab hydrolyse le GTP, libérant Rab-GDP dans le cytoplasme (Alberts et al, 2002).

Les SNAREs sont quant à elles, des protéines transmembranaires qui sont impliquées dans la fusion des vésicules avec la membrane cible et guident de ce fait les vésicules vers leur destination correcte. Les protéines vésiculaires, appelées v-SNAREs et les protéines insérées dans la membrane cible, appelées t-SNAREs se lient de manière complémentaire pour induire la fusion membranaire. Cette association est facilitée par la protéine Rab et son effecteur (EEA1 dans le cas des endosomes précoces) comme le représente la figure I.13.

Rab7, localisé sur les endosomes tardifs s'associe principalement avec les lysosomes et contrôle leur agrégation et fusion (Bucci et al, 2000). Le PI(3)P est détectable dans les vésicules internes des MVBs mais n'est pas présent dans les endosomes tardifs où il serait dégradé du moins partiellement (Gillooly et al, 2000).

La **phosphoinositide (PI) 3-kinase (PI3K)** est impliquée dans plusieurs aspects du trafic membranaire intracellulaire qui régule l'endocytose et la croissance cellulaire, bien que les mécanismes détaillés ne soient pas encore bien établis (Li et al, 1995 ; Araki et al, 1996). La PI3K est formée de deux sous-unités, une sous-unité catalytique (p110) et une sous-unité régulatrice (p85).

Cette enzyme produit du phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P), du phosphatidylinositol 3,4-bis-phosphate PI(3,4)P₂ et du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate PI(3,4,5)P₃. Ces lipides pourraient recruter des protéines contrôlant le cytosquelette d'actine. La PI3K est souvent décrite comme un intermédiaire dans l'endocytose mais des controverses et de nombreuses questions sur son rôle exact restent sans réponse.

L'inhibition de la PI3K semble avoir peu d'effet sur l'endocytose récepteur-dépendante ; par contre elle affecte clairement la pinocytose en phase fluide (Conner et Schmid, 2003). Li et ses collaborateurs constatent cependant un effet de la wortmannine et sur l'endocytose en phase fluide et sur l'endocytose récepteur-dépendante de la transferrine. Ces auteurs montrent également sur un système expérimental de fusion in vitro à partir d'endosomes précoces purifiés, que cette fusion est favorisée par la PI3K activée. Leurs données expérimentales suggèrent également que l'activité de la PI3K est requise pour l'activation de Rab5. Rab5 quant à elle, lie la PI3K, qui à son tour recrute les protéines SNARE (pour une revue voir Pfeffer, 2003). La PI3K régule également la macropinocytose et la phagocytose (Araki et al, 1996).

Quand on inhibe l'enzyme, on constate que la formation de pseudopodes nécessaires à ces deux processus n'est pas perturbée, mais ils ne parviennent pas à se refermer en vésicule intracellulaire. Selon Gillooly et ses collaborateurs, c'est une PI3K de classe I qui interviendrait dans ces étapes précoces. D'après ces auteurs, une PI3K de classe III jouerait un rôle dans la maturation des phagosomes (Gillooly et al, 2001).

D'autres phosphoinositides et phosphoinositides kinases sont probablement également impliqués. Signalons par exemple les phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate qui interagissent sélectivement avec divers protéines de l'endocytose médiée par la clathrine (Conner et Schmid, 2003).

On sait depuis longtemps que les microfilaments sont impliqués dans les étapes précoces de la phagocytose et de la macropinocytose (Conner et Schmid, 2003). Mais des travaux récents suggèrent que la mobilité des organelles et leur distribution ne sont pas seulement dépendantes des microtubules, mais implique également le **cytosquelette d'actine** (Gavin, 1997; DePina et Langfor, 1999). Comme les microtubules, les filaments d'actine-F sont hautement dynamiques et polarisés. Chez la levure, l'inhibition de l'endocytose après traitement avec des toxines qui disruptent le squelette d'actine, suggère que celui-ci est essentiel pour l'endocytose (Ayscough, 2000). Par contre, le traitement des cellules eucaryotes avec des agents disruptant les microfilaments d'actine n'a pas ou peu d'effet sur la formation des vésicules tapissées de clathrine (Fujimoto et al, 2000). Néanmoins, plusieurs protéines accessoires interagissent directement ou indirectement avec la machinerie endocytaire et le squelette d'actine (Qualmann et al, 2000).

Voies d'endocytose	Inhibiteur	Spécificité	Référence
Endocytose Médiée par la clathrine	Anticorps anti-clathrine	+++	Doxsey et al, 1987
	Déplétion en potassium	++	Brodsky et al, 2001
	Bréfeldine A	+	Brodsky et al, 2001
	Chlorpromazine	+	Wang et al, 1993
	Mutant dominant-négatif de la dynamine	+	De Tulleo et Kirchhausen, 1998
	Sous-unité $\mu 2$ du complexe AP-2	+++	Nesterov et al, 1999
Endocytose Médiée par les cavéoles	Cyclodextrine	++	Rothberg et al, 1992
	Mutant dominant-négatif de la cavéoline	+++	Roy et al, 1999
Macropinocytose	Cytochalasine D	++	Maniak, 2001
	Inhibiteurs de la PI3K	+	Araki et al, 1996
	Toxine B	++	Just et al, 1995
	Amiloride	+	West et al, 1989
	Mutants des protéines Rho GTPase	?	West et al, 2000
Endocytose	Mutants des protéines Rho GTPase	?	Ellis et Mellor, 2000
	Inhibiteurs de la PI3K	?	Li et al, 1998
	Inhibiteurs de la PKC	?	Nakano et al, 2000

Tableau I.4 Tableau reprenant les agents interférant avec le chemin endocytaire.

La mobilité des vésicules dépend également des myosines, qui sont des protéines motrices associées à l'actine, ce qui est suggéré par l'atténuation du trafic endocytaire en réponse à des inhibiteurs de la myosine (DePina et Langford, 1999; Raposo et al, 1999). De plus, ces inhibiteurs empêchent la fusion phagosome-endosome (Jahraus et al, 2001). Le rôle de l'actine est bien connu dans la maturation et la mobilité des phagosomes, ainsi qu'au cours des processus comme le "ruffling" et la chimotaxie. Une fois le phagosome détaché de la surface membranaire, la taille du phagosome dicterait le type de système moteur utilisé. Les petits phagosomes ($\leq 1 \mu\text{m}$) se déplaceraient le long des microtubules, alors que les plus larges, seraient propulsés par le cytosquelette d'actine (Toyohara et Inama, 1989).

Des études ont montré que la disruption des filaments d'actine-F diminue le transfert d'endosomes marqués jusqu'au phagosomes *in vivo* (Jahraus et al, 2001) et que les vésicules endosomales sont propulsées par la formation d'une queue d'actine (Taunton et al, 2000). Il a été proposé que les filaments d'actine formés *de novo* peuvent s'étendre à partir des phagosomes pour agir comme "tentacules" afin de faciliter la capture des endosomes. La collision entre ces organelles peut ensuite être facilitée par les myosines. Paradoxalement, la stabilisation de l'actine avec de la phalloïdine, empêche la fusion phagosome-endosome. En attendant de réconcilier ces observations, il a été suggéré que la surstabilisation de l'actine-F forme une barrière physique autour des organelles qui empêche la fusion membranaire.

I.6.7 Les agents interférant avec le processus d'endocytose

Comme nous venons de le voir, il existe différentes voies possibles d'entrée des complexes par endocytose. Il est possible d'agir à divers niveaux de ce processus, à l'aide de plusieurs drogues, disponibles pour moduler le trafic membranaire ou l'organisation fonctionnelle du cytosquelette. Certains agents, tels que la chloroquine sont classiquement utilisés en transfection, alors que d'autres tels que le LY294002, ont exclusivement été utilisés pour comprendre le rôle de la PI3K dans l'endocytose. Le tableau I.4 reprend la liste des principaux outils actuellement disponibles pour interférer avec les différentes voies d'endocytose.

Comme on peut le constater, il s'agit soit d'inhibiteurs plus ou moins spécifiques, soit de mutants (dominants négatifs en autres) qui supposent une transfection des cellules avec la construction.

Dans ce travail, nous utilisons des molécules interférant avec la PI3K, avec les microfilaments et avec l'acidification de l'endosome (figure I.14).

I.6.7.1 Inhibiteurs de la PI3K

Le **LY294002** est un analogue de quercétine qui inhibe spécifiquement la PI3-kinase, de manière réversible. La wortmannine est un autre inhibiteur de la PI3K qui se lie de manière covalente à la sous unité catalytique (p110) impliquée dans la transfert de groupements phosphoryls et inhibe irréversiblement l'activité enzymatique à des concentrations nanomolaires. A la différence de la wortmannine, l'effet inhibiteur du LY294002 n'affecte pas d'autres enzymes, telles que la phosphatidylinositol 4-kinase, la kinase de la chaîne légère de myosine, ou la phospholipase A2. A notre connaissance, aucune expérience de transfection utilisant ce type d'inhibiteur n'a été rapportée à ce jour.

I.6.7.2 Agents interférant avec le cytosquelette d'actine

Une autre possibilité pour moduler le processus d'endocytose, responsable de l'internalisation des complexes, est d'agir au niveau du cytosquelette.

La **cytochalasine B** est un composé produit par des moisissures, qui provoque *in vivo*, la contraction des faisceaux de microfilaments d'actine dans les cellules.

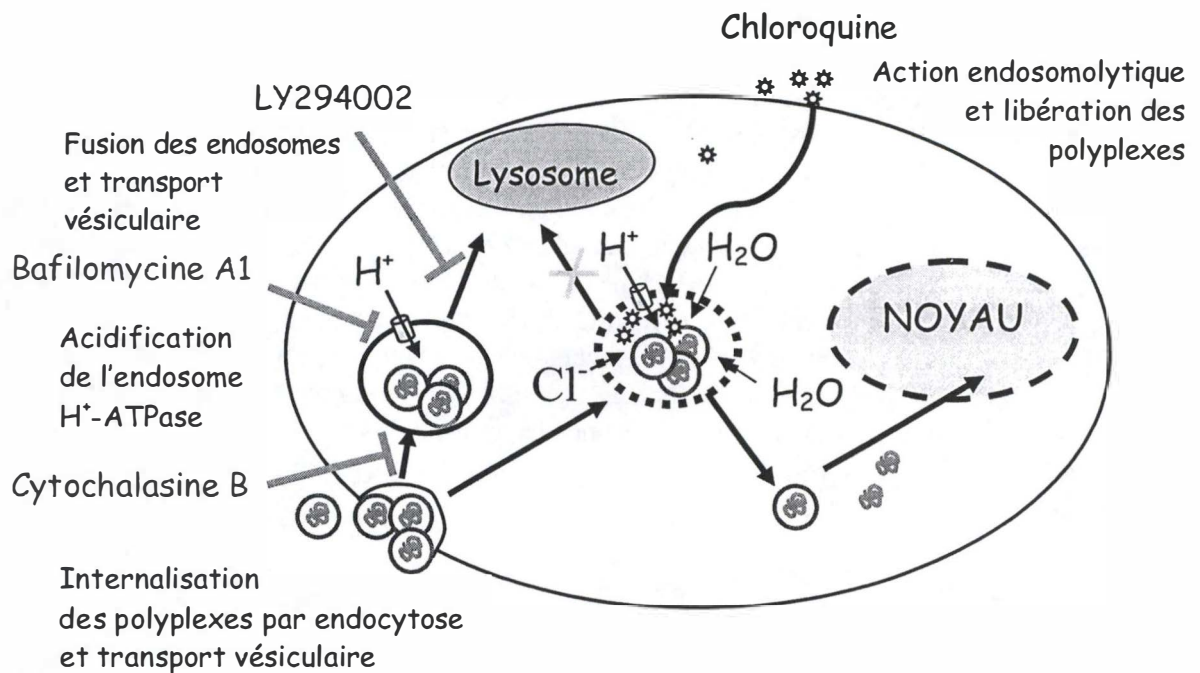


Fig I.14. Représentation schématique du mode d'action des agents interférant avec le processus d'endocytose et le cheminement des polyplexes lors de la transfection. La cytochalasine B bloque la polymérisation des microfilaments d'actine et le LY294002 inhibe la PI3K, qui ont un rôle respectivement dans la régulation du trafic membranaire et la fusion des endosomes. La bafilomycine A1 inhibe les V-ATPases responsables de l'acidification de l'endosome et la chloroquine capte les protons qui entrent par les pompes à protons. La bafilomycine A1 empêche l'acidification de l'endosome et s'oppose à l'effet pompe à protons exercé par un polymère. La chloroquine amplifie l'effet pompe à protons exercé par le polymère et favorise la libération des complexes polymères/ADN, par action endosomolytique.

In vitro, cet inhibiteur bloque spécifiquement la polymérisation à l'extrémité + des microfilaments d'actine. Les cytochalasines sont généralement utilisées pour étudier le rôle de l'actine dans différents systèmes biologiques et peuvent être dans notre cas un outil intéressant pour étudier le cheminement intracellulaire des complexes polymère/ADN. Les microfilaments d'actine ont été impliqués dans la localisation des organelles intracellulaires et le transport vésiculaire. Contrairement aux microtubules, les microfilaments d'actine sont généralement plus court et le transport régulé par l'actine plus lent (environ 0.1 $\mu\text{m/s}$). Le traitement à la cytochalasine affecte effectivement, les processus d'endocytose médié par l'actine, tel que la macropinocytose et la phagocytose. Le traitement au **nocodazole**, qui est un agent dépolymérisant les microtubules diminue l'endocytose adsorptive et l'endocytose en phase fluide (Pratten et al, 1979) et bloque le transport des endosomes précoces aux endosomes tardifs dans les cellules de reins de hamster. Le nocodazole inhibe le transport des vésicules dans les cellules CV-1, alors que la cytochalasine B n'a pas d'effet dans ce type cellulaire (Hamm-Alvarez, 1993).

I.6.7.3 Agents prévenant l'acidification des vésicules endosomiales

La **bafilomycine A1** est un antibiotique qui inhibe sélectivement les pompes H^+ -ATPases vacuolaires. Ces V-ATPases sont responsables de l'acidification de l'espace interne de plusieurs organelles du système vacuolaire. Comme nous l'avons vu au point I.4.3, la sortie des polyplexes des vésicules d'endocytose se produit via un mécanisme « pompe à protons », qui dépend du pH. Une indication dans la validité de cette hypothèse, est que l'expression du gène rapporteur est dramatiquement réduit quand l'acidification des vésicules est inhibée par la bafilomycine A1.

La **chloroquine** est une base faible, elle diffuse à travers la membrane plasmique dans sa forme monoprotonée à pH 7.4 et s'accumule dans les compartiments acides dans sa forme biprotonée. Cet ionophore capte les protons qui entrent par les pompes V-ATPases lors de l'acidification des vésicules endocytaires. La chloroquine, prévient donc l'acidification des endosomes et la neutralisation endosomiale inhibe le transport vers les endosomes tardifs et les lysosomes (Erbacher et al, 1996 ; Zabner et al, 1995). L'hypothèse la plus souvent émise pour expliquer l'effet de la chloroquine sur l'efficacité de transfection de la PLL est que cet agent endosomolytique agit par un mécanisme « pompe à protons », entraînant le gonflement et la déstabilisation des endosomes, facilitant de ce fait la sortie des complexes dans le cytoplasme. Par analogie, le fait qu'un traitement à la chloroquine n'a pas d'effet sur l'efficacité de transfection médiée par le PEI. Cela peut être expliqué par les propriétés endosomolytiques intrinsèques de ce polycation (point I.6.4). Cependant, parmi plusieurs autres agents endosomolytiques utilisés pour la transfection avec la PLL, seule la chloroquine et son analogue, la primaquine améliorent la transfection. D'autre part, il se pourrait que le PEI doive passer par un compartiment acide pour vectoriser efficacement l'ADN, mais que son pouvoir transfectant ne serait pas entièrement lié à la neutralisation de ce compartiment acide. Les mécanismes exacts par lesquels la chloroquine entraîne la sortie des polyplexes des endolysosomes, ne sont pas totalement élucidés.

L'effet des agents représentés à la figure I.14, sur l'efficacité de transfection des complexes polymère/ADN a été testé dans le cadre de ce mémoire afin de mieux comprendre et d'estimer les étapes limitantes de leur cheminement intracellulaire.

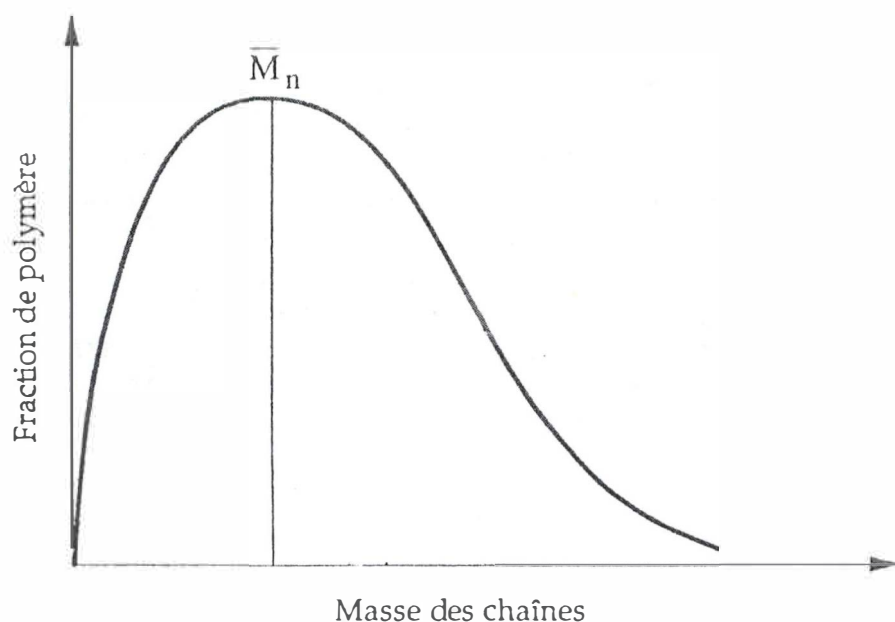


Figure I.15. Courbe de Gausse représentant la distribution des masses moléculaires en nombre $\overline{M}_n$.

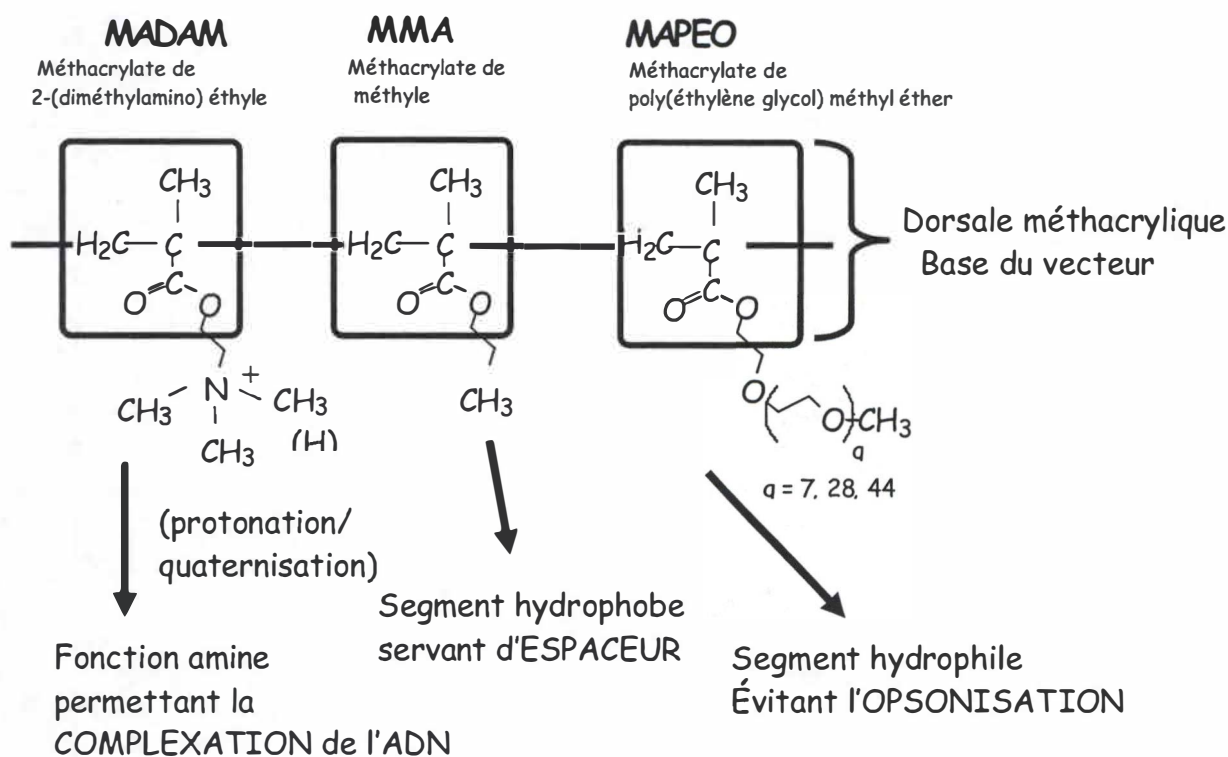


Figure I.16. Représentation schématique d'un polymère de méthacrylate, qui peut être formé à partir de différents types de monomères. La fonction amine du MADAM, chargée positivement peut interagir avec l'ADN. Il est possible d'augmenter le nombre de charge en quaternisant le MADAM. Le motif PEO du MAPEO masque les charges positives pour réduire l'opsonisation. Un monomère non chargé peut également servir d'espaceur pour éviter les interactions MADAM/MAPEO. Il est possible d'augmenter la charge positive du polymère par quaternisation.

I.7 Le projet Polyplexe et objectifs du mémoire

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre général d'un programme de recherche financé par la Région Wallonne : le projet Polyplex. La problématique étudiée est la difficulté de vectoriser de l'ADN exogène au sein de cellules cibles, et ce en particulier si l'on vise une application *in vivo*.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'approche utilisant des vecteurs de synthèse (lipides ou polymères), est particulièrement intéressante pour des raisons de biosécurité, ainsi que pour la facilité, la souplesse et le coût de production de ces vecteurs.

Le but du projet Polyplex est de mettre au point de nouveaux vecteurs synthétiques de type polymère qui soient non toxiques et biocompatibles pour la vectorisation d'ADNp.

Ce projet interdisciplinaire fait intervenir 3 équipes complémentaires :

Le Service des Matériaux Polymères et Composites (SMPC) de l'Université Mons-Hainaut (UMH) dont le rôle est

- de synthétiser les polymères de composition et de structure contrôlées par la méthode ATRP (Atom Transfert Radical Polymerisation),
- d'effectuer la caractérisation physico-chimique des polymères,
- de fonctionnaliser les polymères en vue de greffer des sondes fluorescentes ou des peptides.

Le Laboratoire de Biochimie et de Physiologie Générale de l'Université de Liège (ULG) dont le rôle est

- d'effectuer la caractérisation physico-chimique des polyplexes (complexes polycation/ADN),
- d'évaluer les propriétés d'hématocompatibilité des complexes.

L'Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC) des Facultés Notre-Dame de la Paix (FUNDP) dont le rôle est

- de tester *in vitro* l'efficacité de transfection des polymères synthétisés afin de sélectionner et d'améliorer les plus prometteurs. Ce sont les cellules Cos-7 qui sont utilisées depuis les premières mises au point, car elles sont réputées pour être facilement transfectables. L'étude sera élargie par la suite à d'autres types cellulaires,
- d'étudier le cheminement intracellulaire des polyplexes dans les cellules Cos-7.

Ces vecteurs synthétiques sont des polymères de méthacrylate de (2-diméthylamino)éthyl, plus couramment appelés P(MADAM). Les polymères sont obtenus par polymérisation par voie radicalaire de monomères de MADAM. Il est à noter que la réaction de polymérisation ne génère pas des polymères complètement identiques, mais une population de polymères de longueurs et donc de masses différentes. Les masses se répartissent selon une courbe gaussienne représentée à la figure I.15. Chaque échantillon se caractérise donc par une Masse moyenne en nombre (masse la plus fréquemment rencontrée) ou M_n et une polydispersité D qui reflète l'étalement de la courbe, c'est-à-dire l'écart à l'idéalité.

Les polymères de méthacrylate généralement décrits dans la littérature, sont synthétisés par une voie radicalaire **conventionnelle** et présentent des polydispersités assez élevées (D peut valoir jusqu'à 11) (van de Wetering et al, 1999). Le service SPMC a adapté une technique de polymérisation par voie radicalaire **contrôlée** à la synthèse des polymères de méthacrylate, ce qui a permis l'obtention de polymères ayant une polydispersité inférieure à 1.5. Pour des applications *in vivo*, il est évidemment important de travailler avec des vecteurs les plus homogènes possibles.

De plus, composés d'une dorsale de méthacrylate (figure I.16), ces polymères peuvent être de structures et de compositions différentes.

- **Homopolymères :**

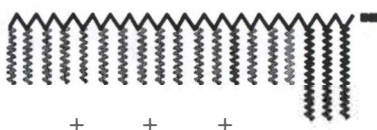
P(MADAM)



- **Copolymères :**

- Copolymères à blocs

P(MADAM)-b-(MAPEO)



- Copolymères statistiques

P(MADAM-co-MAPEO)



- Copolymères avec amorce PEO

(PEO)-b-P(MADAM)

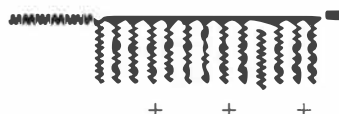


Figure I.17. Représentation schématique des homopolymères et copolymères synthétisés à Mons et les 3 manières de combiner les monomères de MADAM et de MAPEO. Les chaînes PEO peuvent être incorporées à la dorsale selon un mode aléatoire, en bloc, ou sous forme d'amorce.

Ils peuvent être **fonctionnalisés** à la demande pour surmonter les contraintes décrites au paragraphe I.3.2;

- en insérant des **motifs PEO** hydrophiles afin de masquer les charges portées par les groupements amines et réduire de ce fait l'opsonisation et la toxicité des complexes.
- en greffant des **peptides synthétiques** de différents types ;
 - de ciblage permettant une vectorisation plus efficace et spécifique vers les cellules endothéliales par exemple.
 - des peptides fusiogènes pour faciliter la sortie de l'endosome, si le caractère cationique intrinsèque du P(MADAM) ne suffit pas.
 - des peptides de type NLS pour améliorer la translocation vers le noyau.

Jusqu'à présent, les seuls polymères fonctionnalisés, utilisés dans le projet Polyplex sont des copolymères de MADAM et de PEO. Les chaînes de PEO peuvent être insérées de différentes manières par rapport à la dorsale de méthacrylate (pour former des copolymères représentés à la figure I.17);

- de manière aléatoire : les monomères de MADAM et de MAPEO sont ajoutés ensemble, et s'agencent aléatoirement. Nous parlerons dans ce cas de **copolymère statistique** : P(MADAM-co-MAPEO).
- en bloc : la synthèse d'un bloc de MADAM est suivie d'un bloc de MAPEO. On parle dans ce cas de **copolymères à blocs** : P(MADAM)-b-P(MAPEO).
- dans le prolongement de la dorsale : la synthèse d'un bloc de P(MADAM) est réalisée à partir d'un macroamorce de PEO. On parle dans ce cas de **copolymères avec amorceur de PEO** : (PEO)-b-P(MADAM).

De nombreux homopolymères P(MADAM) et copolymères (variant dans l'agencement et dans les proportions respectives des monomères MADAM et MAPEO) ont déjà été synthétisés par le SMPC et testés en transfection à l'URBC.

Au cours de son mémoire (2001-2002), Delphine François avait mis en évidence l'influence de la taille du P(MADAM) sur l'efficacité de transfection des cellules Cos-7. En effet, parmi les polymères testés, le polymère MIWA A25 ayant la plus grande taille (M_n de 37500), s'est avéré le plus efficace (à plus faible rapport polymère/ADN). L'avantage de pouvoir utiliser efficacement ce polymère à faible rapport massique (2/1) est qu'il permet de réduire la toxicité des complexes.

Des différents co-polymères testés, c'est le polymère MIWA A35 (M_n de 30800) qui a donné les meilleurs résultats de transfection tant du point de vue de l'efficacité de transfection que de la reproductibilité entre expériences. Ce copolymère avec amorce de PEO, est relativement pauvre en PEO (0.5 % molaire), par rapports aux autres copolymères qui se sont avérés inefficaces. L'hypothèse proposée pour expliquer cet effet inhibiteur des chaînes PEO (figure I.18), est qu'en masquant les charges positives portées par les monomères de MADAM, le PEO altère la complexation à l'ADN et rend donc les complexes inefficaces en transfection. Cependant, pour travailler en présence de sérum, il est indispensable d'augmenter cette teneur en PEO afin de protéger efficacement les complexes de l'opsonisation.

Pour résoudre ce problème, une nouvelle stratégie a récemment été élaborée au laboratoire, afin d'obtenir des complexes plus riches en PEO tout en gardant une activité transfectante. Cette approche utilise un **mélange séquentiel** d'homopolymères (pour complexer l'ADN) et de copolymères (pour apporter le PEO), afin de former des **complexes ternaires** avec l'ADN (figure I.19).

Il consiste à préparer les complexes en deux temps selon un ordre logique, afin d'éviter que le PEO n'interagisse avec le P(MADAM) :

- L'ADN est d'abord complexé au P(MADAM).
- Le co-polymère est ensuite ajouté aux complexes formés.

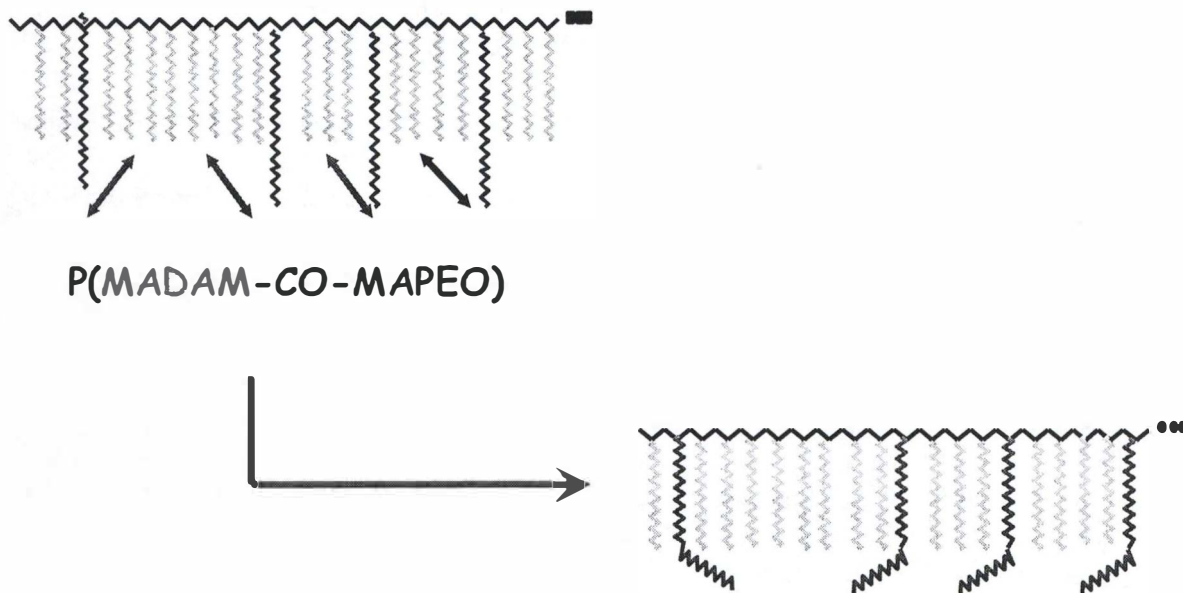


Figure I.18. Représentation schématique du phénomène d'interaction entre les chaînes de MADAM et de MAPEO dans un copolymère statistique. Cette hypothèse a été émise pour expliquer l'inefficacité de transfection des copolymères lorsque la teneur en PEO augmente : les chaînes de PEO masquent les charges positives portées par les chaînes de MADAM, empêchant une complexation efficace avec l'ADN.

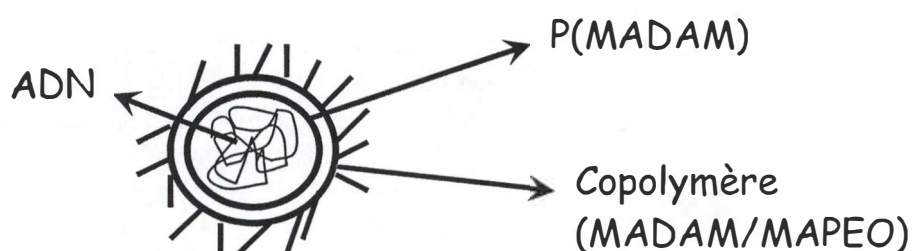


Figure I.19. Représentation hypothétique d'un complexe ternaire (copolymère [P(MADAM)/ADN]), formé en 2 temps. Les charges positives portées par le P(MADAM) permettent de complexer l'ADN. Le copolymère interagit avec le P(MADAM) probablement par la dorsale de méthacrylate. De ce fait les segments PEO sont exposés en surface du complexe.

L'hypothèse est que de cette manière, le co-polymère se trouve à l'extérieur du complexe et les chaînes PEO sont mieux placées pour jouer leur rôle protecteur en présence de sérum.

Le copolymère utilisé pour les mises au point de cette approche est le MIWA A61 (Mn de 24100) qui appartient à la famille P(MADAM)-b-P(MAPEO) et contient des chaînes de MAPEO en concentration 9 % molaire. Il a été utilisé en combinaison avec le P(MADAM) MIWA A25. Cette stratégie innovatrice semble être une piste prometteuse qui permet à l'heure actuelle, de relever l'inhibition de l'efficacité de transfection du polymère MIWA A25 en présence de sérum. De plus, le caractère biocompatible de ces complexes ternaire a été mis en évidence à l'ULG. Ce sont donc de bons candidats pour une application *in vivo*.

En début d'année, nous avons reçu un nouveau poly(MADAM) plus long, le SEMO B64 (Mn de 49100), qui s'est avéré, dans une expérience préliminaire, plus efficace pour la transfection de cellules Cos-7 en culture que le polymère MIWA A25. Lors d'une application *in vivo*, un polymère de cette taille n'est pas compatible avec la capacité de filtration rénale de l'organisme. Cependant, vu que nous travaillons *in vitro*, et que les faibles taux de transfection limitent certaines approches expérimentales, nous avons décidé de nous placer dans les meilleures conditions de transfection pour entamer ce mémoire. C'est pourquoi, nous avons choisi le polymère SEMO B64 pour transfecter les cellules Cos-7 tout au long de ce travail.

Dans un premier temps, nous avons recherché la combinaison SEMO B64/MIWA A61 qui donne les meilleurs résultats.

Après quoi nous avons pu aborder l'objectif du mémoire, qui consiste à étudier les étapes précoces du cheminement intracellulaire des complexes formés à partir du P(MADAM) SEMO B64 seul, ou en combinaison avec le co-polymère MIWA A61.

Il faut savoir que les mécanismes de transfection, permettant aux complexes polymère/ADNp d'entrer dans la cellule, d'atteindre son noyau et d'y être transcrit, sont encore largement méconnus.

Ce travail n'est donc pas une étude fondamentale visant à décrire précisément les mécanismes d'action impliqués dans l'internalisation et le cheminement des complexes, mais bien une approche préliminaire afin d'estimer si :

- l'entrée des complexes au sein des cellules s'effectue selon un mode de type endocytose.
- une étape précise rencontrée lors de la transfection est limitante.

Cela nous permettra éventuellement d'orienter la synthèse de nouveaux polymères vers une forme plus efficace ou de proposer des pistes pour modifier la structure des polymères déjà testés, dans le but d'augmenter leur pouvoir transfectant.

Le mémoire se divise donc en deux parties :

Dans la première partie, nous avons utilisé des agents chimiques qui agissent de manière relativement spécifique avec les étapes précoces du processus d'endocytose pour tester leurs effets sur l'efficacité de transfection des cellules Cos-7 avec les polymères. De cette manière nous espérons mieux cerner la ou les étape(s) limitante(s) rencontrée(s) lors de la transfection.

Dans la seconde partie, nous avons suivi les complexes marqués (dont l'ADN est marqué à l'aide d'une molécule intercalante) au sein des cellules par une méthode histochimique suivie d'une analyse au microscope confocal. En marquant les différents compartiments impliqués dans la voie d'endocytose, nous espérons préciser le cheminement intracellulaire des complexes dans la cellule au cours du temps.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1 Culture cellulaire

II.1.1 Modèle cellulaire :

Au cours de ce mémoire, nous avons travaillé avec la lignée cellulaire Cos-7, issue de reins de singes. Ce modèle cellulaire a été choisi car il est facilement transfectable. Les polymères sont donc testés sur les cellules Cos-7, afin d'estimer leur efficacité de transfection.

II.1.2 Matériels et solutions :

- Boîtes de culture de 75 cm² (T75) (Costar, Réf 3375).
- PBS (phosphate buffer saline) : Tampon phosphate (K₂HPO₄/KH₂PO₄) 10 mM, pH 7.4 ; NaCl 0.9 %.
- Trypsine / EDTA (Gibco, Réf 25 300-054).
 - Trypsine (0.5 µg/ml).
 - EDTA (acide éthylènedinitrotétraacétique) (0.2 µg/ml).
- Milieu de base composé de :
 - DMEM : Dulbecco's Modified Eagles Medium. (Gibco, 31 885-023).
 - Pénicilline (100 U/ml), Streptomycine (100 µg/ml) (Bio- Whittacker, Réf : DE17602E).
 - HEPES : 20 mM acide N-[2-Hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthanesulfonique] (Acros, Réf : 172572500).
- Milieu complet composé de :
 - Milieu de base +10 % FBS (Sérum de veau fœtal) (Gibco, Réf 10 270-106).

II.1.3 Méthode :

- Lorsque les cellules arrivent à confluence, il convient de les repiquer dans des boîtes de culture T75. Afin d'éviter toute contamination, il est nécessaire de travailler sous hotte à flux laminaire.
- Après avoir ôté le milieu, les cellules sont rincées deux fois avec 10 ml de PBS stérile, préchauffé à 37°C.
- 1 ml de trypsin/ EDTA est déposé sur les cellules pendant 1 à 2 min afin de les détacher.
- 9 ml de milieu complet sont ajoutés à la suspension cellulaire pour neutraliser l'effet de la trypsin.
- A l'aide d'une pipette pasteur, les cellules sont transvasées dans un tube stérile de 10 ml (Stérilin).
- Cette suspension cellulaire est centrifugée 10 min à 1000 rpm.
- Le surnageant est éliminé et le culot, contenant les cellules, est resuspendu dans 10 ml de milieu complet.
- Un comptage des cellules est réalisé au moyen d'une chambre de Neubauer afin de déterminer la densité cellulaire.
- Les cellules sont ensemencées dans des boîtes T75 Costar à raison de :
 - 0.75 10⁶ cellules le vendredi
 - 1.5 10⁶ cellules le lundi et mercredi
 dans 20 ml de milieu complet.
- Elles sont incubées sous atmosphère humide à 37°C et 5 % CO₂ (étuve Jouan).

II.2 Préparation des polymères

Les polymères sont synthétisés au service des matériaux polymères et composites (SMPC) à l'Université de Mons-Hainaut. Ils nous sont fournis sous forme lyophilisée pour une plus longue conservation. Afin d'être dans les conditions optimales de transfection, déterminées préalablement, nous testons les polymères solubilisés dans du tampon HBS (Hepes Buffer Saline) 20 mM HEPES , 0.9 % NaCl, pH 7.4.

Les solutions stock de polymères sont préparées à une concentration de 1 ou 2 mg/ml de manière suivante :

- Le polymère est pesé dans un tube Stérilin de 10 ml.
- Du tampon HBS est ajouté pour obtenir la concentration désirée.
- L'ensemble est agité pendant 24 h à température ambiante.
- Les polymères sont filtrés sur filtres 0.2 μ m (Sarstedt), avant d'être testés en transfection.
- Ils sont conservés à 4°C.

II.3 Transfection des cellules Cos-7 par les complexes polymère/pCMV β

II.3.1 Principe :

La transfection peut être définie comme l'introduction de matériel génétique exogène en vue d'une expression au sein de cellules eucaryotes. Cette méthode est réalisée avec des cellules Cos-7 ensemencées dans des boîtes à 12 puits, à raison de 20 000 cellules/puits.

Ensuite, les complexes polymère/plasmide pCMV β sont formés et ajoutés aux cellules. Ce plasmide code pour l'enzyme de la β -galactosidase de *Escherichia coli*.

Le taux de transfection sera évalué par un dosage d'activité de cette enzyme 24 h après transfection (voir II.4). En parallèle, un dosage protéique est réalisé afin d'exprimer l'activité β -galactosidase en fonction de la quantité de protéines dans le puits (II.5). La fig II.1 reprend de manière schématique, les étapes principales d'une expérience de transfection ainsi que les conditions choisies.

II.3.2 Matériels :

- Plaques 12 puits (Costar, Réf : 3513).
- ADN pCMV β (Clontech, Réf : 6177-1) préparé à grande échelle et dans des conditions « endotoxin-free » par la firme Plasmidfactory (Allemagne).
- SuperFect : 3 mg/ml (Quiagen, Réf : 301305).
- DMEM : (Gibco, Réf 31 885-023).
- PBS : tampon phosphate 10 mM ; pH 7.4 ; NaCl 0.9 %.
- HBS : tampon HEPES 20 mM ; pH 7.4 ; NaCl 0.9 %.
- Chloroquine : (SIGMA, Réf : C-6628).
- Bafilomycine A1 : (SIGMA, Réf : B-1793).
- Cytochalasine B : (SIGMA, Réf : C-6762).
- LY294002 : (Calbiochem, Réf : 440202).

II.3.3 Méthode :

- Ensemencement des cellules :

Les cellules sont repiquées la veille dans des plaques multipuits (12 puits) à raison de 20 000 cellules/puits dans 1 ml de milieu complet. (voir matériels-méthode paragraphe II.1).

- Préparation des complexes :

- La préparation des complexes se réalise sous hotte à flux laminaire vertical dans un volume final de 75 μ l. Les volumes et quantités données ici correspondent à ce qui est utilisé par puits.
- Pour la préparation de complexes ternaires, la réaction se réalise en deux temps : L'ADNp est d'abord complexé au P (MADAM) SEMO B64 utilisé dans un rapport optimal de 2/1 (w/w). Après 30 min, le co-polymère MIWA A61 est ensuite ajouté dans un rapport 5/1, pour une nouvelle incubation de 30 min.
- Pour les complexes formés à partir d'un seul type de polymères, 1 μ g d'ADNp est dilué dans le tampon HBS, pH 7.4. Le polymère, préalablement dilué dans le tampon HBS, est ensuite ajouté dans le rapport polymère/ ADN choisi (w/w). Le tout est incubé 60 min à température ambiante pour la formation des complexes et pour travailler dans les mêmes conditions que les complexes ternaires, un volume d'HBS (équivalent au volume de MIWA A61) est ajouté après la première période de 30 min.
- Dans le cas du superfect (SF) qui nous sert de référence, 1 μ g d'ADN est dilué dans du DMEM, auquel nous ajoutons le SF dans le rapport 6/1. Le temps d'incubation n'est que de 15 min.
- Après complexation, 425 μ l de DMEM, avec ou sans sérum, sont ajoutés aux tubes contenant les complexes de transfection.

- Transfection :

- Les complexes sont transférés sur les cellules préalablement lavées au PBS et celles-ci sont incubées 3 h à 37°C, 5 % CO₂.
- Les cellules sont rincées avec 1 ml de DMEM seul.
- Les cellules sont ensuite incubées 24 h à 37°C, 5 % CO₂, en présence de 1 ml de milieu de culture contenant 5 % de sérum.
- Pour les expériences réalisées en présence d'agents interférant avec l'endocytose (Chloroquine, Bafilomycine A1, Cytochalasine B et LY294002), ceux-ci sont ajoutés aux cellules :
 - Soit en même temps que les complexes.
 - Soit 15-30 min avant les complexes.

II.4 Révélation de l'activité β -galactosidase

II.4.1 Principe :

Afin d'estimer le taux de transfection, l'activité β -galactosidase est révélée 24 h après celle-ci, par deux méthodes assez rapides et très sensibles qui nous donnent 2 types de renseignements :

- Révélation en colorimétrie :

Elle permet de doser l'activité β -galactosidase dans le lysat cellulaire en utilisant le 2-O-nitrophényl β -D-galactopyranoside (ONPG) comme substrat. Un des deux produits de la réaction (le 2-nitrophénol) étant coloré en jaune, sa production peut être quantifiée par une mesure de l'absorbance à 405 nm. Cette méthode colorimétrique est applicable à un grand nombre de conditions et convient bien pour des expériences de criblage.

- Révélation en histochimie :

Elle permet de déterminer le nombre de cellules transfectées au sein d'une population en utilisant le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside) comme substrat de l'enzyme, après fixation des cellules. Le produit de la réaction étant bleu, les cellules transfectées deviennent elles mêmes bleues et peuvent être comptabilisées.

II.4.2 Matériels :

- Plaques 96 puits (Greiner bio-one, Réf : 655101).
- PBS : tampon phosphate 10 mM ; pH 7.4 ; NaCl 0.9 %.
- M-PER : Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce, Réf : 78501).
- Substrat pour le dosage de l'activité β -galactosidase :
 - 2-O-nitrophényl β -D-galactopyranoside (ONPG) 4.4 mM (Acros, Réf : 12 882-0010).
 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 2 mM (Merck)
 - 2-Mercaptoéthanol 100 mM (Fluka, Réf : 63690)
 - Tampon PBS.
- Solution de fixation pour le test histochimique :
 - Formaldéhyde 2 % (Belgolabo, Réf : 494002)
 - Glutaraldéhyde 0.2 % (Fluka, Réf : 49629)
 - Tampon PBS.
- Solution de coloration pour le test histochimique : (β -gal Staining set, Roche, Réf : 1828673).
 - 5 % de solution X-gal.
 - 95 % de Iron buffer : ferrocyanure de potassium et ferricyanure de potassium dans du tampon phosphate (PBS).

II.4.3 Méthode :

• En colorimétrie

- Les cellules sont rincées 2 fois avec 1 ml de PBS non stérile préchauffé à 37°C.
- 300 µl de tampon de lyse (M-PER) sont ajoutés. Les plaques sont incubées 15 min sur un vortex rotatif.
- Après avoir détaché les cellules, le lysat est transvasé dans un tube en plastique et le dosage est effectué directement, dans une plaque 96 puits.
- Selon les conditions, les échantillons sont dilués de manière différente.
 - Les contrôles : 100 µl d'échantillon sont engagés
 - Pour les puits contenant les complexes, le dosage se fait à 2 dilutions ;
 - Soit pour le SF :
 - 10 µl d'échantillon + 90 µl de tampon de lyse
 - 20 µl d'échantillon + 80 µl de tampon de lyse
 - Soit pour les polymères de méthacrylate :
 - 15 µl d'échantillon + 85 µl de tampon de lyse
 - 30 µl d'échantillon + 70 µl de tampon de lyse
 - Les blancs : 100 µl de tampon de lyse.
- 100 µl de substrat β -gal (ONPG) sont ajoutés à chaque échantillon.
- Après 15 et 30 min d'incubation à 37°C, l'absorbance est lue à 405 nm dans le Microplate Imaging System de Bio-Rad.
- Les valeurs d'absorbance auxquelles on soustrait celle du blanc, sont remultipliées par le facteur de dilution correspondant, pour obtenir l'activité β -galactosidase totale (exprimée en unités arbitraires ou u.a) par puits.

• En histochimie

- Les cellules sont rincées au PBS non stérile (1 ml/puits).
- 1 ml de fixateur est ajouté pendant 15 min à température ambiante.
- Les cellules sont rincées 3 fois au PBS (1 ml/puits).
- 500 µl de colorant dilué 1/20 sont ajoutés aux cellules fixées.
- Une incubation de 30 à 60 min à 37°C est requise.
- Les cellules sont à nouveau rincées 3 fois avec 1 ml de PBS.
- Les cellules transfectées, colorées en bleu sont comptabilisées au microscope.

II.5 Dosage de protéines (Bradford)

II.5.1 Principe :

Afin de normaliser les résultats d'activité β -galactosidase, reflet de l'efficacité de transfection, nous réalisons un dosage de protéines présentes dans les échantillons. Ceci permet d'exprimer l'activité β -gal, non plus en u.a / puits, mais en u.a / 100 µg de protéines. De plus, ce dosage permet d'avoir une estimation de la toxicité des polymères sur les cellules.

Il se réalise parallèlement à la révélation colorimétrique, c'est-à-dire 24 h après la transfection, par la méthode de Bradford. Si cela n'est pas effectué immédiatement, les échantillons sont conservés à -80°C.

La méthode de Bradford a l'avantage par rapport au Folin d'être facile à utiliser, d'obtenir une absorbance du complexe protéine-colorant qui reste stable au moins 60 min, et surtout cette technique est compatible avec le tampon de lyse que nous utilisons (M-PER).

Cette méthode de dosage protéique est basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le colorant : le bleu de Coomassie G250. Ce réactif, rouge / brun à l'état libre, prend une teinte bleue suite à sa liaison aux protéines (Bradford M, 1976). Sachant que l'absorbance maximale de la solution acide de bleu de Coomassie shift de 465 nm vers 595 nm, quand elle est liée aux protéines, on mesure l'intensité de la coloration à 595 nm au spectrophotomètre. Cette intensité est proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

II.5.2 Matériels :

- Etalon d'albumine sérique bovine BSA : 2 mg/ml (Pierce, Réf : 23210)
- Colorant bleu de Coomassie (Bio-Rad, Réf : 500-006).
- Tampon de lyse (M-PER) (Pierce, Réf : 78501).

II.5.3 Méthode :

- Les points de la droite d'étalonnage sont préparés à partir de BSA 2 mg/ml diluée dans de l'H₂O distillée pour obtenir des concentrations de 75, 50 et 25 µg /ml. A 100 µl de chaque solution étalon sont ajoutés 50 µl de M-PER et 650 µl d'H₂O.
- A 50 µl de tampon de lyse sont ajoutés 750 µl d'H₂O, correspondant au point 0 de la courbe de calibration.
- A 50 µl d'échantillon sont ajoutés 750 µl d'H₂O.
- 200 µl de colorant Bio-Rad sont ensuite ajoutés à chaque tube.
- La lecture est réalisée après 30 min d'incubation à 595 nm sur le spectrophotomètre Ultrospec 2100 pro (Biochrom, Angleterre).
- En portant en graphique les valeurs d'absorbance correspondant aux différentes dilutions étalons (dont le blanc est déduit), en fonction de la concentration en albumine, nous obtenons une droite dont l'équation est : $y = ax$; où y = absorbance (DO) à 595 nm, x = concentrations de protéines (µg/ml), et a = pente de la droite. Donc pour passer d'une valeur d'absorbance à une concentration en protéine, nous appliquons la formule suivante : $x = y/a$. Les résultats nous donne la quantité de protéines dans les 50 µl de lysat engagés. Afin d'obtenir la quantité de protéines totale par puits (dans les 300 µl de MPER ajoutés au point II.4.3), il faut encore multiplier par 6.
- L'activité β -galactosidase spécifique exprimée en u. a par 100 µg de protéines est calculée en divisant l'activité β -galactosidase totale (obtenue comme décrit au point II.4.3), par la quantité de protéines totale en multipliant le tout par 100.

I.6 Analyse statistiques des résultats

Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ la déviation standard (DS) de 3 déterminations. La recherche des différences significatives entre les moyennes a été réalisée par le test t-student non païré.

II.7 Etude du cheminement intracellulaire des complexes par immunocytochimie

II.7.1 Principe :

- Le marquage de l'ADNp complexé aux polymères, à l'aide d'une molécule intercalante, nous permet de visualiser les complexes au sein des cellules Cos-7 après transfection. Le plasmide pCMV β est préalablement marqué avec une molécule intercalante (YOYO-1) qui rend l'ADN fluorescent, avant de réaliser la transfection. Seule la forme de la sonde liée à l'ADN est fluorescente (λ exc : 491 nm / λ ém : 509 nm), elle est détectable dans le vert.
- L'utilisation d'anticorps dirigés contre des protéines exprimées de manière spécifique dans un compartiment cellulaire donné, permettra de suivre la distribution intracellulaire des complexes. Nous utilisons des anticorps primaires dirigés contre des protéines membranaires spécifiques de différents compartiments cellulaires (la protéine **EEA1** pour les endosomes précoces, la protéine **Rab-7** pour les endosomes tardifs et la protéine **Lamine B** pour le noyau). Ensuite, des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome sont dirigés contre les anticorps primaires. Ce qui permet de visualiser ces compartiments cellulaires au microscope confocal. Le fluorochrome Alexa choisi (λ exc : 568 nm / λ ém : 603 nm) émet dans le rouge, afin de pouvoir mettre en évidence les colocalisations avec l'ADN exogène.
- Par analyse au microscope confocal, l'observation simultanée de différentes sondes fluorescentes permet, par superposition des images obtenues, d'estimer si il y a colocalisation des complexes avec tel ou tel compartiment marqué. L'inconvénient de la microscopie à épi-fluorescence classique, est la perte de résolution de l'image due à l'excitation des fluorochromes se situant hors du plan focal. En effet, les fluorochromes sont excités par le laser sur toute l'épaisseur de la préparation, ce qui se traduit par une image contaminée par un bruit de fond. L'intérêt de la microscopie confocale à balayage et laser (CLSM pour confocal laser scanning microscopy), est de pouvoir éliminer la lumière provenant des plans défocalisés qui parasitent le plan focal. Le microscope combine une source laser monochromatique et un système de balayage de la préparation qui permet d'étudier des spécimens épais (à 3 dimensions) sous forme de sections optiques, et de n'enregistrer que l'image de la fluorescence émise dans le plan (figure II.3).

II.7.2 Matériels :

- PBS : tampon phosphate 10 mM pH 7.4 ; NaCl 0.9 %
- BSA (bovine serum albumin) : 2 % dans du PBS (Réf : Sigma : A-4503)
- Triton X-100 : 0.2 % ou 1 % dans du PBS (Sigma, Réf : T-9284)
- Paraformaldéhyde (PFA) : 4% dans du PBS (Merck, Réf : 4005)
- Anticorps primaires :
 - Anti Rab-7 [200 μ g/ml] (Santa-Cruz, Réf : 10767, Immunoglobulines de lapin)
 - Anti EEA1 [200 μ g/ml] (Santa-Cruz, Réf : 6414, Immunoglobulines de chèvre)
 - Anti EEA1 [250 μ g/ml] (Transduction Laboratories, Réf : E 41120, Immunoglobulines de souris)
 - Anti Lamine B [200 μ g/ml] (Santa Cruz, Réf : 6216, Immunoglobulines de chèvre)

- Anticorps secondaires :
 - Immunoglobulines de chèvre anti IgG de lapin couplées à l'Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Réf : A-11011) ou à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Réf : A-11008)
 - Immunoglobulines de singe anti IgG de chèvre couplées à l'Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Réf : A-11057)
 - Immunoglobulines de chèvre anti IgG de souris couplées à l'Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Réf : A-11004)
- YOYO-1 (Molecular Probes, Réf : Y-3601).
- Mowiol (Aldrich, Réf : 32 459-0) préparé dans du tampon PBS 30 % glycérol (Merck, Réf : 4094).

II.7.3 Méthode :

- Les cellules sontensemencées la veille dans des plaques 24 puits sur des couvre-objet en verre à raison de 10 000 cellules/puits.
- L'ADNp est préalablement incubé avec l'agent intercalant fluorescent (1 molécule de YOYO-1 pour 200 ou 300 paires de bases) pendant 30 ou 60 min à l'obscurité.
- L'ADNp marqué est complexé aux polymères comme décrit au paragraphe II.3.3, et le tout est ensuite déposé sur les cellules. Toutes les étapes suivantes sont effectuées à l'abri de la lumière afin de préserver le fluorochrome marquant les complexes.
- A des temps déterminés, de 15 min à 9 h après transfection, les couvre-objet sont ôtés du milieu et rincés au PBS préchauffé à 37°C.
- Les cellules sont fixées avec de la PFA 4% à 4°C durant 10 min (0.5 ml/puits).
- Les cellules sont rincées 3 fois au PBS et sont perméabilisées avec du PBS + Triton X-100 0.2 % durant 10 min ou 1 % pendant 5 min.
- 2 incubations de 15 min en présence de BSA 2 % sont requises pour bloquer les sites non spécifiques.
- Pour l'incubation avec l'anticorps primaire, 30 µl d'anticorps [2 ou 2.5 µg/ml] dans du PBS/BSA sont déposés sur un morceau de parafilm. Le couvre-objet est retourné sur la goutte d'anticorps, pour une incubation de 2 h dans une chambre humide, à température ambiante.
- Les couvre-objet sont retournés et replacés délicatement dans la plaque 24 puits et les cellules sont rincées 3 fois au PBS/BSA.
- Pour l'incubation avec l'anticorps secondaire, nous procédons de la même manière (excepté qu'ils sont à une concentration de 1 µg/ml). Le temps d'incubation est de 1 h, toujours à l'obscurité pour préserver les fluorochromes.
- Les cellules sont rincées 3 fois au PBS/BSA.
- Les couvre-objet sont finalement montés sur une goutte de Mowiol chauffé à 50°C déposée sur une lame.
- Les lames sont placées 16 h à 4°C avant l'analyse des cellules au microscope confocal.

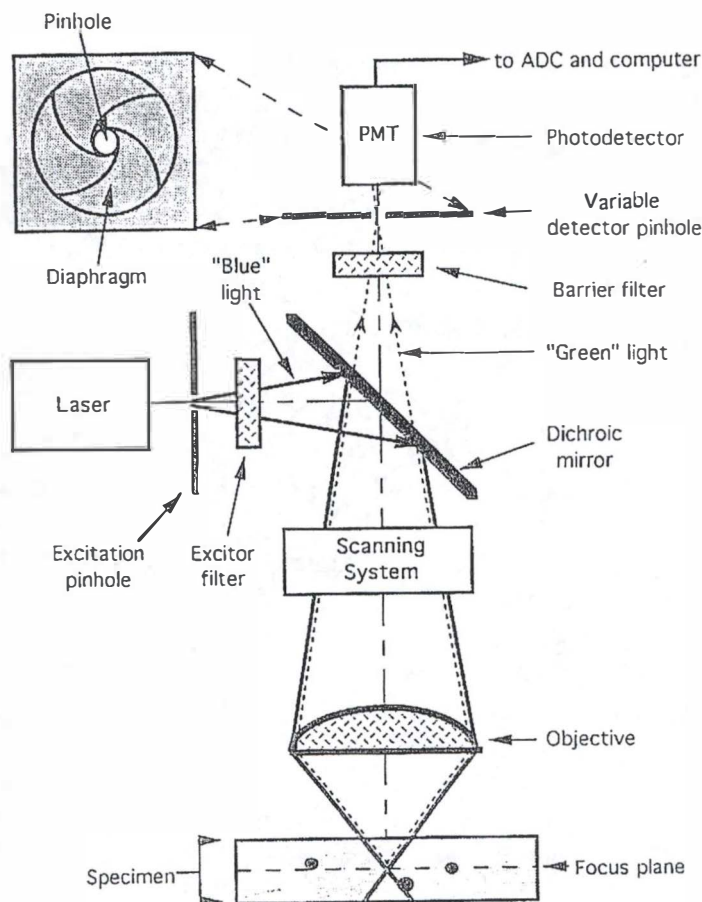


Figure II.2. Schéma du principe et de la composition du microscope confocal

La lumière d'excitation émise par le **laser** passe par un « **pinhole d'excitation** » qui focalise la source en point lumineux. Le faisceau est filtré au moyen d'un **filtre d'excitation** qui permet à la fois de sélectionner la ou les raies d'intérêt ainsi que de moduler séparément leur intensité respective. La lumière d'excitation est ensuite réfléchié spécifiquement par un **miroir dichroïque**, qui est transparent pour les rayons émis par les fluorochromes. Un deuxième miroir mobile permet d'assurer le balayage du champ observé. La lumière d'excitation est alors focalisée en un point de la préparation via l'**objectif** du microscope. Ce dernier capte ensuite la lumière émise par les fluorochromes excités.

La lumière émise par le point focal est focalisée via l'objectif sur le capteur (**photomultiplicateur, PMT**) qui transforme le signal lumineux en signal électrique. Par contre celle émise par des fluorochromes situés au-dessus et au-dessous du plan focal est filtrée à l'entrée du détecteur par la présence d'un « **pinhole de sortie** ».

II.7.4 Analyse au microscope confocal : (Leica DM IRBE Diamond Pro 91TXM)

Le principe du microscope confocal est de focaliser, par l'intermédiaire d'un pinhole à l'excitation, un faisceau de lumière émise par une source laser, qui excite les fluorochromes en un point de l'échantillon (figure II.2).

La source lumineuse utilisée est un laser Argon-Krypton qui produit 3 lignes d'excitation de longueurs d'ondes (couleurs) distinctes : 488 nm (bleu), 568 nm (vert), 647 nm (rouge), permettant d'effectuer des marquages multiples. La préparation est balayée point par point suivant l'axe des x et des y grâce à des miroirs mobiles. Un pinhole à l'émission ou pinhole de sortie (trou d'épingle), présent à l'entrée du photodétecteur, ne récupère **que** la fluorescence émise à partir du point illuminé. Les photons provenant du plan focal sont donc captés par le photodétecteur pour être amplifiés et transformés en signal électrique dont l'intensité est proportionnelle au nombre de photons reçus. Ce signal est numérisé et peut être ensuite traité afin d'améliorer le rapport signal / bruit. En déplaçant la préparation suivant l'axe z, une série de plans optiques successifs sont pris dans l'épaisseur de la cellule. Cela permet de reconstruire une image tridimensionnelle.

De plus la superposition d'images obtenues avec des canaux différents permet de visualiser la co-localisation éventuelle des complexes polymère / ADNp-yoyo avec les compartiments marqués.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont divisés en deux parties. Nous commencerons par décrire les polymères et les conditions de transfection utilisés. Ensuite, nous présenterons les résultats obtenus dans s à l'étude préliminaire de l'internalisation et du cheminement intracellulaire des complexes. Pour cela nous avons utilisé deux approches :

- l'utilisation d'agents chimiques qui agissent sur différentes étapes précoces afin de tester leur effet sur l'efficacité de transfection de cellules Cos-7 avec les polymères utilisés,
- le suivi de complexes ternaires marqués, après transfection de cellules Cos-7 via la microscopie confocale, afin d'observer si ceux-ci passent par une voie classique d'endocytose.

III.1 Présentation des conditions expérimentales utilisées.

III.1.1 Le gène rapporteur

L'ADN plasmidique choisi pour réaliser les transfections est le pCMV β contenant :

- une origine de réplication bactérienne pour être amplifié dans *Escherichia coli*.
- un gène de résistance à l'ampicilline afin de sélectionner les bactéries transformées (qui ont intégré le plasmide) sur milieu avec ampicilline.
- un gène Lac Z qui code pour l'enzyme de la β -galactosidase (β -gal) de *E. coli*, placé sous le contrôle du promoteur fort de CMV (cytomégalovirus).

L'ADN est préparé par la firme PlasmideFactory dans des conditions « endotoxin free », c'est-à-dire dans des conditions où un maximum de précautions sont prises pour éliminer les endotoxines bactériennes. Il s'agit de lipopolysaccharides contenus dans la membrane externe des bactéries Gram négatives pouvant être libérés lors de l'amplification du plasmide dans *E. coli*. Ces endotoxines peuvent interférer avec la formation des complexes et sont toxiques pour l'organisme ou pour les cellules en culture. C'est pourquoi il est indispensable de les éliminer dans le cadre de la thérapie génique. Il est préférable de faire de même pour la transfection *in vitro*.

L'avantage d'utiliser le pCMV β comme gène rapporteur est qu'il permet d'estimer l'efficacité de transfection par deux méthodes complémentaires : comptabiliser le nombre de cellules transfectées au sein d'une population, par une méthode histochimique et mesurer l'activité de l'enzyme β -gal dans le lysat cellulaire, par un test colorimétrique.

III.1.2 L'agent transfectant de référence

Le SuperFect (SF) est un polycation de type dendrimère activé décrit au point I.3.2, commercialisé par la firme Qiagen. Il est choisi comme agent de référence car il possède un bon pouvoir transfectant, notamment vis-à-vis des cellules Cos-7 utilisées dans ce travail. Il est donc repris en tant que contrôle positif dans les expériences de transfection réalisées dans le cadre de la première approche de ce mémoire.

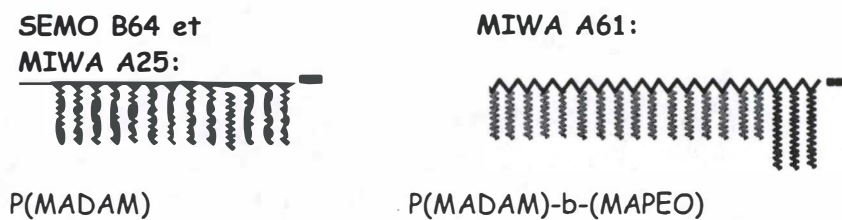


Figure III.1 Représentation schématique des polymères de méthacrylate utilisés pour transfecter des cellules Cos-7 dans le cadre du mémoire. Les polymères SEMO B64 et MIWA A25 sont des homopolymères de MADAM et le polymère MIWA A61 est un co-polymère à bloc contenant 9 % de MAPEO.

III.1.3 Description des polymères de méthacrylate

Nous avons travaillé avec deux homopolymères P(MADAM) :

- le polymère MIWA A25 ($M_n = 37\,500$), qui est le P(MADAM) de référence,
- le polymère SEMO B64 ($M_n = 49\,100$), nouveau polymère que nous désirons tester. Pour les raisons évoquées dans le chapitre I.7, il convient mieux pour des applications *in vitro*.

Le copolymère, déjà utilisé précédemment, est un copolymère à bloc, appelé MIWA A61 de $M_n 24\,100$ et contenant du MAPEO à raison de 9 % molaire. Rappelons que ce copolymère n'a aucune activité transfectante par lui-même, mais il est capable, en combinaison avec le MIWA A25 d'assurer la transfection des cellules Cos-7 en présence de sérum.

La structure de ces polymères est représentée schématiquement à la figure III.1.

Avant d'entamer l'étude du cheminement des complexes proprement dite, nous avons défini les conditions à utiliser pour la combinaison SEMO B64 et MIWA A61.

III.1.4 Transfection des cellules Cos-7 avec les complexes SEMO B64/pCMV β

Comme tout nouveau polymère reçu, le SEMO B64 a été testé en transfection sur des cellules Cos-7 dans différents rapports de masse polymère/ADN. Ceci permet de déterminer le rapport optimal pour ce type de polymère, en comparaison avec le rapport préalablement choisi pour le polymère MIWA A25.

La figure III.2 illustre une expérience réalisée avec des complexes formés à partir de SEMO B64 pour des rapports polymère/ADN de 0.5/1 à 4/1 (w/w), en absence de sérum. Dans la même expérience, des cellules Cos-7 ont également été transfectées avec des complexes MIWA A25/pCMV β dans le rapport optimal utilisé précédemment (2/1, w/w) ou SF/pCMV β (6/1, w/w) comme références. L'axe des abscisses présente les différents rapports polymère/ADN utilisés et celui des ordonnées l'expression enzymatique de l'enzyme β -gal (par 100 μ g de protéines). L'activité β -gal, révélée 24 h après transfection par un dosage colorimétrique, reflète l'efficacité de transfection en fonction des différents rapports testés. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (u.a) par 100 μ g de protéines après un dosage protéique réalisé en parallèle.

L'activité β -gal maximale est atteinte pour des rapports SEMO B64/ADN de 2/1 (w/w) et elle est de l'ordre de 25 u.a/100 μ g de protéines. L'efficacité de transfection du polymère SEMO B64 est 2,5 fois plus élevée que celle obtenue pour le polymère MIWA A25 (11 ± 0.6 u.a./100 μ g de protéines) (non montré), mais toujours inférieure à celle obtenue pour le SF (144 ± 24 u.a./100 μ g de protéines) (non montré). Dans son mémoire, Delphine François avait montré que la taille du P(MADAM) influence à la fois :

- le niveau maximum d'activité β -gal : le taux de transfection augmente avec la taille du polymère, ce que nous observons bien ici,
- le rapport polymère/ADN donnant l'activité maximale de transfection: quand la taille du polymère augmente, le rapport polymère/ADN optimal diminue. Ceci ne semble plus vrai à partir d'une certaine taille puisque les polymères MIWA A25 et SEMO B64 présentent tous les deux un maximum d'activité transfectante à partir de 2 μ g/puits.

Le SEMO B64 semble très efficace en absence de sérum, mais qu'en est-il en présence de sérum ?

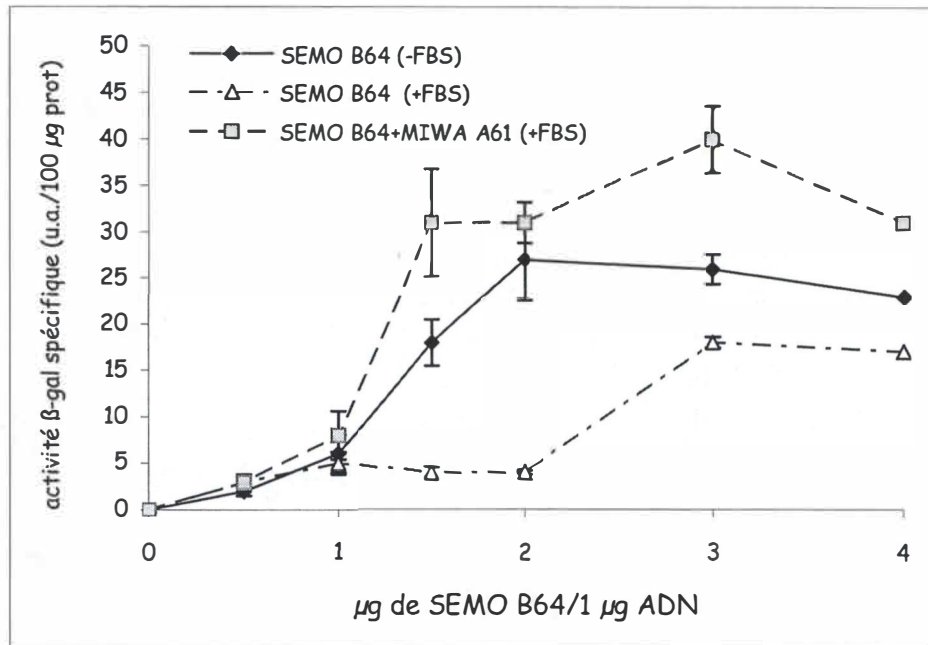


Figure III.2 Transfection des cellules Cos-7 avec le polymère SEMO B64 en absence et en présence de sérum. Les cellules Cos-7, ensemencées à raison de 20 000 cellules par puits, sont transfectées avec des complexes SEMO B64/pCMC β pour différents rapports polymère/ADN (w/w) avec 1 μg d'ADN engagé, en absence ou en présence de sérum. Les cellules sont également transfectées avec les complexes ternaires MIWA A61 [SEMO B64/pCMV β], en présence de sérum. Le polymère MIWA A61 est utilisé à 5 $\mu\text{g}/1\mu\text{g}$ d'ADN. L'activité β -gal a été quantifiée 24 h après transfection, par un test colorimétrique. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ DS ($n = 3$).

III.1.5. Les complexes ternaires MIWA A61 [SEMO B64/pCMV β]

Généralement, le sérum inhibe la transfection avec les polymères polycationiques car il contient des protéines qui peuvent s'adsorber sur les complexes.

Pour résoudre le problème, il est possible d'introduire dans un complexe une molécule hydrophile comme le PEO qui masque les charges des complexes pour réduire les interactions indésirables avec les protéines sériques. Une stratégie innovatrice et efficace, développée au laboratoire est basée sur la formation des complexes ternaires en 2 étapes : l'ADN est complexé et condensé par le P(MADAM), et les complexes formés sont ensuite incubés en présence de copolymère contenant du PEO. Cette méthode mise au point précédemment avec le polymère MIWA A25 a montré, en effet, que l'ajout du copolymère MIWA A61 permet de retrouver au moins le taux de transfection observé avec le MIWA A25 en absence de sérum (cfr I.7).

Nous avons donc testé le polymère SEMO B64, seul ou en combinaison avec le polymère MIWA A61 en présence de sérum, pour vérifier que nous observons le même phénomène. La figure III.2 montre que la courbe d'activité β -gal observée dans les cellules transfectées en présence de sérum est déplacée vers la droite par rapport à celle obtenue en absence de sérum. Pour 2 μ g de SEMO B64, le taux de transfection est pratiquement nul. En combinaison avec le copolymère MIWA A61, en présence de sérum, nous retrouvons l'efficacité de transfection obtenue avec le polymère SEMO B64 seul, en absence de sérum. Dans cette expérience, nous observons une amélioration de cette efficacité, ce qui n'est pas toujours le cas. En effet, l'efficacité de transfection moyenne $\pm$ déviation standard (DS) pour toutes les expériences (12) réalisées est de :

- 37 $\pm$ 16 u.a./100 μ g de protéines pour les complexes ternaires, en présence de sérum.
- 40 $\pm$ 13 u.a./100 μ g de protéines pour le polymère SEMO B64 seul, en absence de sérum.

Pour les différentes transfections (13) réalisées avec le SF, la moyenne $\pm$ DS des activités β -gal obtenues est de 146 $\pm$ 43 u.a./100 μ g de protéines.

Dans l'expérience présentée dans la figure III.2, le rapport massique MIWA A61/ADN est de 5/1, ce qui correspond en fait au rapport optimal observé pour les complexes formés avec le polymère MIWA A25. Nous avons également fait varier la quantité de MIWA A61 engagée en combinaison avec le polymère SEMO B64, pour adapter éventuellement ce rapport (figure III.3). Les cellules Cos-7 sont transfectées avec des complexes SEMO B64/pCMV β (2/1, w/w), en absence ou en présence de sérum. En présence de sérum, les cellules sont également transfectées avec des complexes ternaires MIWA A61[SEMO B64/pCMV β] pour différents rapports MIWA A61/ADN.

Comme observé précédemment, l'efficacité de transfection avec le polymère SEMO B64 seul est fortement diminuée en présence de sérum. Lorsque nous ajoutons le copolymère MIWA A61 en combinaison avec le polymère SEMO B64, nous observons une augmentation de l'efficacité de transfection, en présence de sérum, en fonction de la quantité de polymère MIWA A61 ajoutée. Cette augmentation se stabilise à un niveau proche de l'activité obtenue pour le polymère SEMO B64 sans sérum à partir de 4 μ g de MIWA A61 ajoutés. Etant donné que le rapport 5/1 (w/w) se situe au niveau de ce plateau, nous avons décidé de garder ce même rapport pour former les complexes ternaires tout au long de ce travail.

Nous avons pu dès lors transfecter efficacement les cellules Cos-7, en présence de sérum, avec des complexes ternaires formés à partir de 2 μ g de polymère SEMO B64 et de 5 μ g de copolymère MIWA A61.

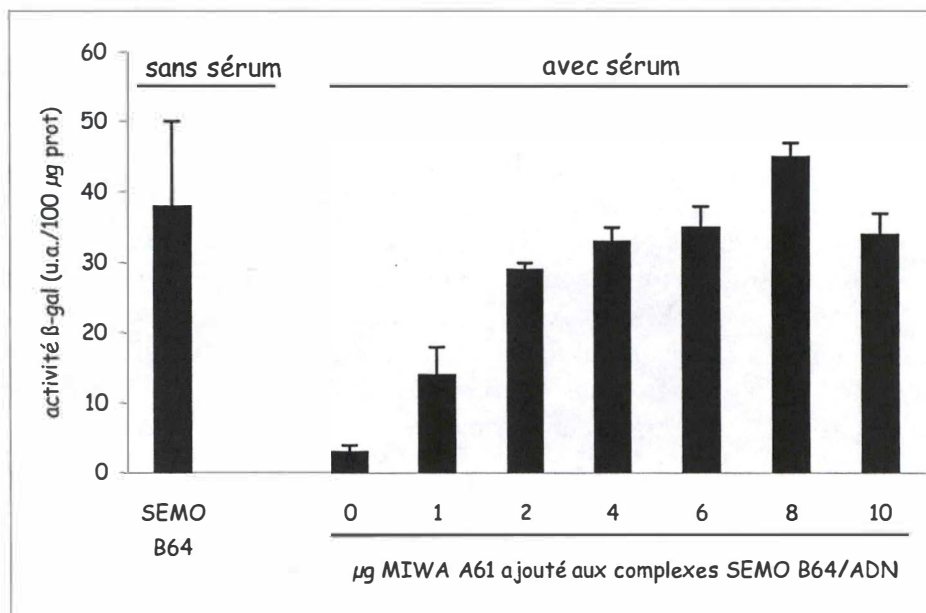


Figure III.3 Transfection des cellules Cos-7 avec des complexes ternaires formés à partir de 2 μg de polymère Semo B64 et de quantités différentes en copolymère MIWA A61. Les cellules Cos-7, ensemencées à raison de 20 000 cellules par puits, sont transfectées avec des complexes Semo B64/pCMV β (2/1, w/w), en absence de sérum. En présence de sérum, les cellules sont transfectées avec des complexes ternaires MIWA A61[Semo B64/pCMV β] dans différents rapports MIWA A61/ADN (w/w); avec 2 μg de polymère Semo B64. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ DS ($n = 3$).

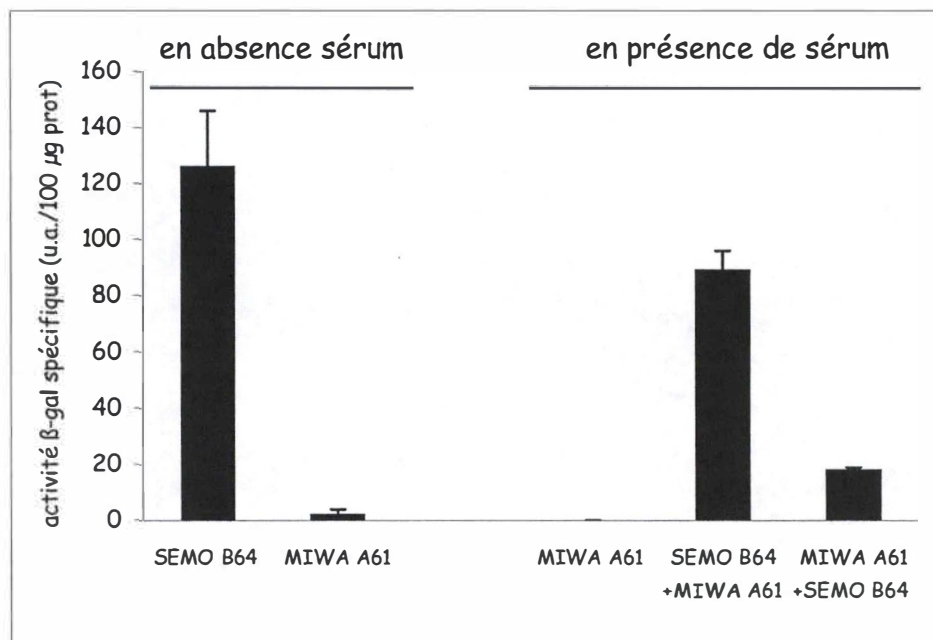


Figure III.4 Importance de l'ordre d'addition des polymères P(MADAM)/co-polymère ou co-polymère/P(MADAM) sur le taux de transfection. Les cellules Cos-7,ensemencées à raison de 20 000 cellules/puits, sont transfectées par les complexes SMO B64/pCMVβ (2/1, w/w) et MIWA A61/pCMVβ (5/1, w/w), sans sérum. En présence de sérum, le co-polymère MIWA A61 seul a été testé comme contrôle négatif. Les complexes ternaires testés en présence de sérum, ont été préparés selon un ordre d'addition différent : soit le polymère MIWA A61 est ajouté aux complexes P(MADAM)/ADN (SMO B64+MIWA A61) ou soit le polymère SMO B64 est ajouté aux complexes co-polymère/ADN (MIWA A61+SMO B64). Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ DS (n = 3).

Nous avons voulu vérifier si l'ordre d'addition des polymères SEMO B64 et MIWA A61 avait de l'importance pour l'activité des complexes ternaires. Les cellules Cos-7 sont transfectées par les complexes SEMO B64/ADN (2/1, w/w) ou MIWA A61/ADN (5/1, w/w), en absence de sérum. Seul, le MIWA A61 a été testé en présence de sérum comme contrôle négatif. Les complexes ternaires testés, en présence de sérum, ont été préparés soit :

- comme décrit plus haut, c'est-à-dire en ajoutant le polymère MIWA A61 aux complexes [SEMO B64/ADN] préformés.
- selon l'ordre inverse, c'est-à-dire en ajoutant le polymère SEMO B64 aux complexes [MIWA A61/ADN] préformés.

Les résultats sont donnés à la figure III.4. Comme attendu, en absence de sérum, nous observons une activité β -gal pratiquement nulle pour le polymère MIWA A61 seul et très importante pour le polymère SEMO B64. En présence de sérum, le polymère MIWA A61 seul est inefficace. Le polymère SEMO B64 seul n'a pas été testé en présence de sérum dans cette expérience, mais nous avons déjà constaté que son efficacité de transfection est fortement réduite en présence de sérum (figure III.2 et III.3). La combinaison de ces deux types de polymères, selon le premier mode de préparation, permet d'observer une activité β -gal en présence de sérum, qui représente 71 % de l'activité β -gal détectée avec les complexes SEMO B64/pCMV β . En comparaison, avec le second mode de préparation, nous observons une activité β -gal 5 fois plus faible. Ces résultats confirment l'importance du mode de préparation en deux temps et selon un ordre précis. Ceci est conforme avec l'hypothèse que chaque polymère doit pouvoir assurer correctement sa fonction propre :

- complexer et condenser l'ADN pour le P(MADAM)
- protéger les complexes des composants du milieu pour le copolymère.

Il est donc important que les motifs de PEO du copolymère soient placés à l'extérieur des complexes ternaires ainsi formés, pour permettre une transfection efficace en présence de sérum.

Au vu de ces résultats, nous avons choisi les conditions suivantes pour la suite du travail :

polymères	Dénomination des complexes binaires ou ternaires	rapport massique	sérum
P(MADAM)	SEMO B64/pCMV β	(2/1)	-
P(MADAM)+copolymère	MIWA A61[SEMO B64/pCMV β]	(5/2/1)	+

III.1.6 Estimation de l'efficacité de transfection par 2 méthodes de révélation

L'intérêt d'utiliser la construction pCMV β avec le gène rapporteur β -gal lors de la transfection, est de pouvoir révéler son expression par deux méthodes différentes. La méthode colorimétrique, rapide et très sensible est couramment utilisée pour doser l'activité β -galactosidase. Il est cependant intéressant de déterminer le pourcentage de cellules transfectées. La méthode histochimique nous permet de le faire. Pour vérifier que les deux types de renseignements obtenus nous permettent d'estimer l'efficacité de transfection de manière équivalente, nous avons comparé les deux méthodes de révélation dans la même expérience.

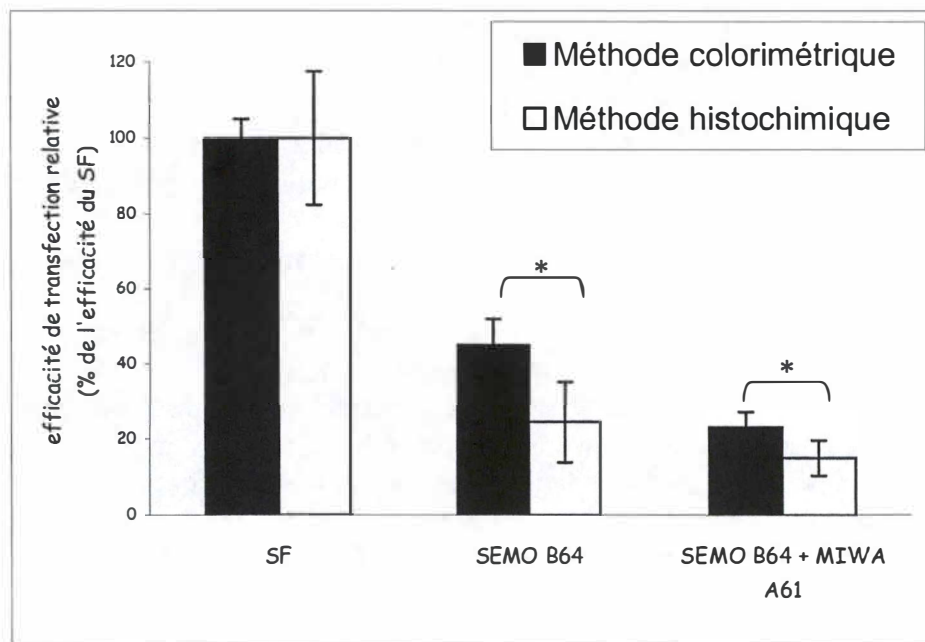


Figure III.5 Comparaisons des deux types de méthodes utilisées pour estimer l'efficacité de transfection des polymères testés. Les cellules Cos 7, ensemencées à raison de 20 000 cellules/puits, sont transfectées avec les complexes SF/pCMV β (6/1, w/w) ou SEMO B64/pMCV β (2/1, w/w) en absence de sérum; ou avec les complexes ternaires MIWA A61[SEMO B64/pCMV β] (5/2/1, w/w/w), en présence de sérum. L'expression de l'activité β -galactosidase a été mesurée 24 h après transfection, simultanément par le test colorimétrique et le test histochimique comme décrit dans Matériels et Méthodes. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ DS ($n = 3$ pour la méthode colorimétrique; $n = 15$ pour la méthode histochimique). Ils sont rapportés en % de l'efficacité du SF.

* résultats significativement différents avec $p = 0.05$.

Les cellules Cos-7 ont été transfectées avec des complexes SF/pCMV β (6/1, w/w) en absence de sérum, des complexes SEMO B64/pCMV β et des complexes ternaires MIWA A61[SEMOB64/pCMV β]. L'expression de l'activité β -gal a été mesurée 24 h après transfection, par la méthode colorimétrique et la méthode histochimique comme décrit dans Matériels et Méthodes au point II.4.3. Le pourcentage de cellules transfectées pour les différentes conditions est de 19.5 % pour le SF, de 4.8 % pour le polymère SEMO B64 et de 2.9 % pour les complexes ternaires. Afin de pouvoir comparer les deux méthodes entre elles, nous avons exprimé les résultats en pourcentage de l'efficacité de transfection obtenue pour le SF (portée à 100) (figure III.5). Nous pouvons voir que les 2 méthodes donnent des résultats relativement proches pour le polymère SEMO B64 ou la combinaison ternaire, même si les valeurs obtenues en histochimie sont systématiquement plus faibles et les déviations standard plus grandes. Ceci peut être expliqué par le fait que cette méthode ne tient pas compte de toutes les cellules, mais uniquement des plages cellulaires choisies aléatoirement, à partir desquelles les comptages sont réalisés. Malgré le fait que cette méthode soit moins précise et plus fastidieuse, elle est utile pour voir réellement ce que représente la valeur d'activité β -gal de transfection *in vitro* et elle permet également d'observer l'état des cellules transfectées et de les localiser.

Après avoir choisi les polymères et les conditions de transfection des cellules Cos-7 qui seront utilisés tout au long de ce travail, nous abordons à présent l'objectif proprement dit du mémoire. Il consiste à étudier les étapes précoces empruntées par les complexes au sein des cellules Cos-7 transfectées, afin de mieux comprendre si les complexes formés à partir du polymère SEMO B64, passent par une voie classique d'endocytose comme ce serait le cas pour d'autres types de polymères décrits dans la littérature.

III.2 Etude du cheminement intracellulaire des complexes formés à partir de deux types de polymères.

III.2.1 Utilisation d'agents interférant avec les étapes précoces d'endocytose

La première approche possible pour l'étude du cheminement des polyplexes dans les cellules Cos-7, consiste à agir à divers niveaux du processus d'endocytose, généralement décrit comme voie d'entrée des polyplexes dans la cellule. Pour réaliser cette approche, nous avons utilisé des agents chimiques couramment utilisés dans la littérature pour agir de manière **relativement** spécifique à l'une ou l'autre étape de ce processus (voir point I.6.7) : la **cytochalasine B** permet de bloquer la polymérisation des microfilaments d'actine impliqués dans la formation des vésicules d'endocytose et le transport vésiculaire ; le **LY294002** est un inhibiteur de la PI3K jouant également un rôle dans le processus d'endocytose en favorisant la fusion et le transport membranaire ; la **chloroquine** et la **bafilomycine A1** agissent au niveau du pH des vésicules endosomales. Nous avons testé leurs effets sur l'efficacité de transfection des complexes polymère/ADN, afin de mieux cerner la ou les étape(s) limitante(s) rencontrée(s) par ces complexes, lors de leur cheminement au sein des cellules Cos-7.

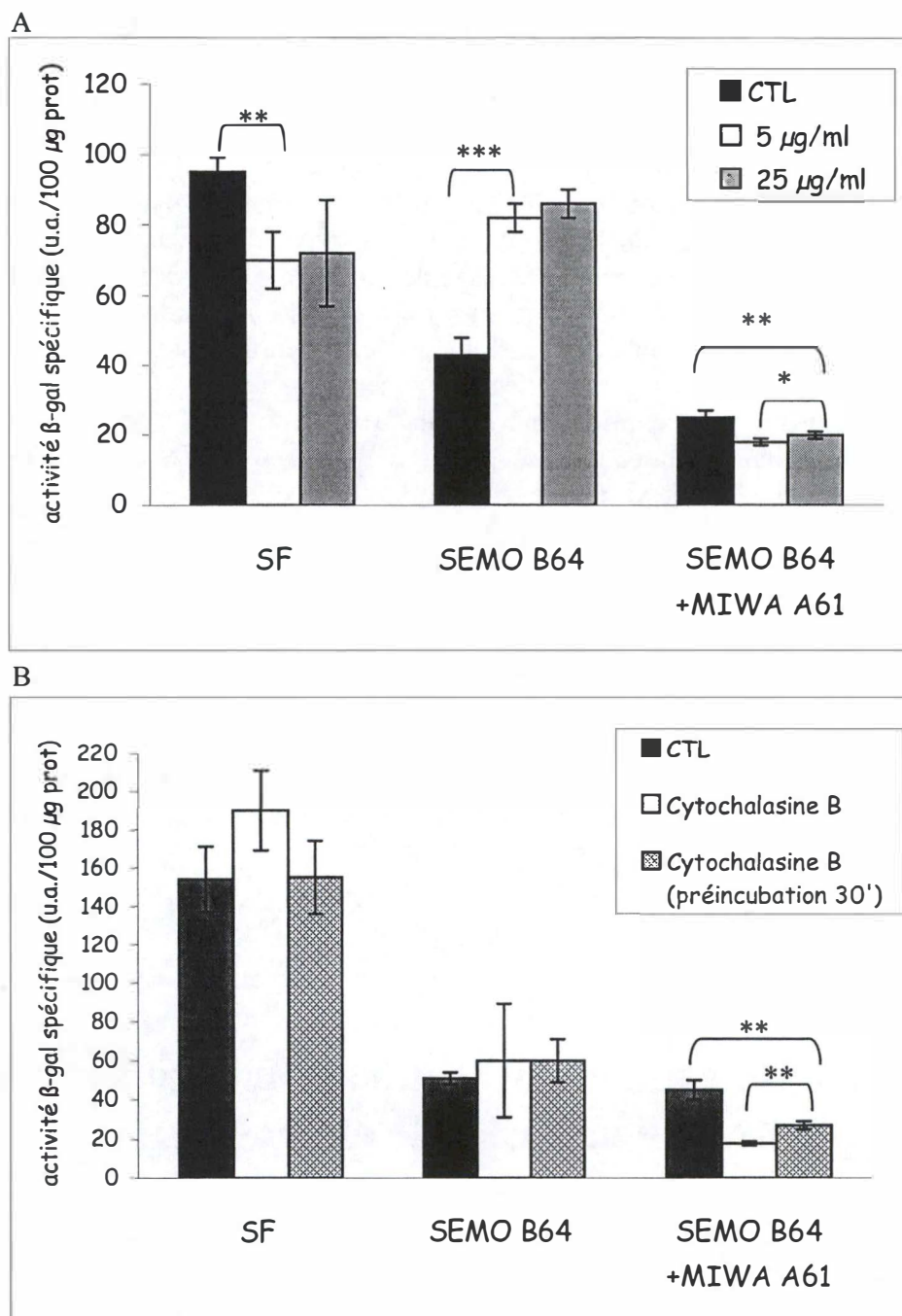


Figure III.6 Influence de la cytochalasine B sur l'efficacité de transfection des cellules Cos-7 avec les complexes formés à partir de SEMO B64. Les cellules Cos-7, ensemencées à raison de 20 000 cellules/puits, sont transfectées avec les complexes SF/pCMV β (6/1, w/w) ou SEMO B64/pCMV β (2/1, w/w) en absence de sérum; ou avec les complexes ternaires MIWA A61[SEMO B64/pCMV β] (5/2/1, w/w/w) en présence de sérum. A) La cytochalasine B (5 ou 25 µg/ml) est ajoutée en même temps que les complexes, pendant les 3 h de transfection. B) La cytochalasine (5 µg/ml) est ajoutée 30 min avant les complexes et pendant les 3 h de transfection. Les résultats obtenus sont exprimés comme la moyenne $\pm$ DS (n = 3).

Les résultats reliés par une accolade sont significativement différents avec un $p = 0.05$ (*), $p = 0.01$ (**), $p = 0.001$ (***)

III.2.1.1 La cytochalasine B

La cytochalasine B agit au niveau du cytosquelette d'actine en bloquant la polymérisation des microfilaments et inhibe de ce fait les voies d'endocytose dépendantes de l'actine. En supposant que les complexes utilisés passent par une de ces voies, le traitement à la cytochalasine B devrait se traduire par une inhibition de leur internalisation et par conséquent du taux de transfection. En effet, une étude réalisée à partir de microsphères de latex et de complexes lipidiques a montré que la cytochalasine B (5 µg/ml) inhibe la pinocytose des microbilles de 10 nm (65 %) et la phagocytose des microbilles de 2 µm (93 %) mais pas l'endocytose médiée par les récepteurs. De plus, l'entrée des complexes lipides/ADN est réduite de 50 % en présence de cytochalasine B (Matsui et al, 1996).

C'est pourquoi, nous avons testé l'effet de la cytochalasine B sur l'efficacité de transfection des complexes formés à partir du polymère SEMO B64. La figure III.6A illustre les résultats obtenus en présence de cytochalasine B (5 et 25 µg/ml). Ce sont les concentrations généralement utilisées dans la littérature (Matsui et al, 1996; Zelphati et al, 1996). Les cellules Cos-7 sont transfectées avec des complexes SF/pCMVβ, des complexes SEMO B64/pCMVβ, ou avec des complexes MIWA A61[SEMOB64/pCMVβ].

La cytochalasine est présente uniquement pendant les 3 h de transfection. La solution stock étant préparée dans du DMSO, nous ajoutons également la même quantité de DMSO pour la condition contrôle sans cytochalasine (0.1 %).

Un dosage de biomasse résiduelle a été effectué en parallèle avec le dosage de l'activité de la β-gal. La cytochalasine ne présente aucune toxicité. En effet, dans les cellules transfectées en présence de cytochalasine, nous retrouvons 99 ± 4 % de la biomasse mesurée en absence de cytochalasine. Nous avons également vérifié que le DMSO n'avait pas d'effet sur l'efficacité de transfection des polycations en comparaison avec la condition sans DMSO (non montré). Nous observons dans l'expérience illustrée à la figure III.6A une légère diminution de l'efficacité de transfection pour le SF et pour les complexes ternaires en présence de cytochalasine. Très curieusement, nous avons une augmentation de l'efficacité de transfection pour le polymère SEMO B64 seul.

Dans cette première expérience, la cytochalasine est ajoutée en même temps que les complexes. Nous avons donc voulu voir si le fait de l'ajouter 30 min avant les complexes (afin que les microfilaments d'actine soient dépolymérisés avant la période de transfection) modifie son action sur l'efficacité de transfection des polycations (figure III.6B). Les résultats sont surprenants, nous observons une inhibition pour la combinaison SEMO B64/MUIWA A61, ce n'est pas le cas pour les deux autres polycations testés. D'autre part, les résultats présentés à la figure B sont qualitativement différents de ceux présentés plus haut, dans le sens où cette fois-ci la cytochalasine n'a aucun effet bénéfique sur l'efficacité transfection des cellules Cos-7 avec le polymère SEMO B64 seul.

Devant des effets aussi divergents, nous avons recommencé plusieurs fois l'expérience et les résultats sont récapitulés dans le tableau III.1. Il est à noter que certaines expériences ont été réalisées avec une concentration en cytochalasine de 25 µg/ml, d'autres avec une concentration de 5 µg/ml (les valeurs avec une °). Comme ces deux concentrations produisent des effets comparables, nous avons tenu compte de toutes les données obtenues.

Etant donné la grande variabilité des résultats d'une expérience à l'autre, nous ne pouvons déduire que des tendances générales.

# expérience	SF	SEMO B64	SEMO B64+MIWA A61
1	74°/76	191°/200	72°/80
2	123°	118°	40°
3	89°	170°	78°
4	108	103	43
5	124	287	79
moyenne	99	178	65**
DS (n = 6)	22	66	19

Tableau III.1. Effets de la cytochalasine B sur l'efficacité de transfection avec différents polymères. Les efficacités de transfection sont exprimées en pourcentage moyen de l'efficacité détectée dans la condition sans cytochalasine B. La cytochalasine a été utilisée à 25 µg/ml ou 5 µg/ml (°).

** significativement différent de la condition SEMO B64 avec p = 0.01.

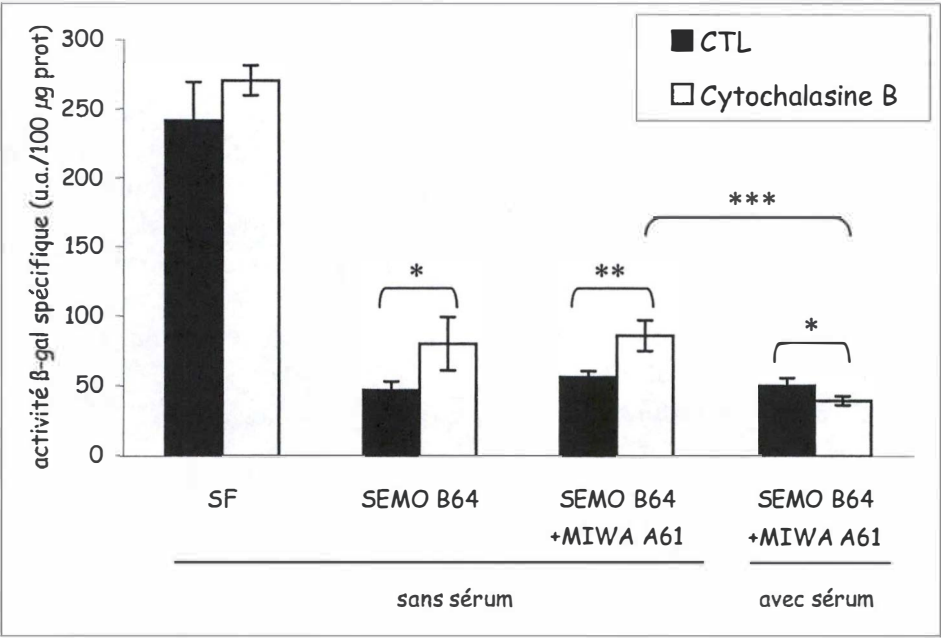


Figure III.7 Influence du sérum sur l'efficacité de transfection des cellules Cos-7 avec les complexes ternaires en présence de cytochalasine B. Les cellules Cos-7, ensemencées à raison de 20 000 cellules/puits, sont transfectées avec les complexes SF/pCMVβ (6/1, w/w) ou avec les complexes SEMO B64/PCMVβ (2/1, w/w), en absence de sérum. Les cellules sont transfectées avec des complexes ternaires MIWA A61[SEMO B64/pCMVβ] (5/2/1, w/w/w), en absence ou en présence de sérum. La cytochalasine B (5 µg/ml) est ajoutée en même temps que les complexes, pendant les 3 h de transfection. Les résultats obtenus sont exprimés comme la moyenne ± DS (n = 3).

Les résultats reliés par une accolade sont significativement différents avec un p = 0.05 (*), p = 0.01 (**), p = 0.001 (***).

- Pour le SF, la présence de cytochalasine B n'a pas d'effet sur l'efficacité de transfection.
- Pour le polymère SEMO B64, la présence de cytochalasine B a plutôt tendance à améliorer l'efficacité de transfection (de $\pm 80\%$).
- Pour le mélange des polymères SEMO B64 et MIWA A61, la présence de cytochalasine B a un effet inhibiteur sur l'efficacité de transfection (de $\pm 35\%$).

Les trois types de polycations semblent donc être différemment sensibles à la cytochalasine B. C'est particulièrement frappant pour les complexes SEMO B64/ADN et MIWA A61[SEMO B64/ADN].

Ces 2 types de complexes varient dans leur composition en polymères. En outre, les cellules Cos-7 sont transfectées avec des complexes SEMO B64/ADN en absence de sérum alors que dans l'autre cas, elles sont transfectées en présence de sérum. Nous avons donc vérifié si l'effet de la cytochalasine est indépendant de l'absence ou de la présence de sérum. Il n'est pas possible de transfecter les cellules Cos-7 avec des complexes SEMO B64/pCMV β en présence de sérum, comme nous l'avons montré au point III.1.5. Cette comparaison a donc été réalisée avec les complexes ternaires (figure III.7).

Nous observons une tendance inversée de l'effet de la cytochalasine lorsque les cellules sont transfectées en présence ou en absence de sérum : la présence de cytochalasine a tendance à améliorer l'efficacité de transfection des trois types de polycations lorsque les cellules Cos-7 sont transfectées en absence de sérum ; alors que l'efficacité des complexes ternaires utilisés en présence de sérum diminue légèrement avec la cytochalasine, comme nous l'avons remarqué précédemment.

Le sérum a donc une influence sur l'effet de la cytochalasine pour les complexes ternaires.

III.2.1.2 Le LY294002

Comme nous l'avons vu au point I.6.7.1, la PI3K semble réguler le trafic membranaire et l'organisation fonctionnelle du cytosquelette, intervenant dans le processus d'endocytose. En effet, l'activité de la PI3K influence la dynamique des endosomes précoces (Conner et Schmid, 2003), que les complexes peuvent atteindre via différentes routes possibles. Nous supposons donc que l'inhibition de la PI3K peut avoir un effet sur l'efficacité de transfection des complexes utilisés, si ceux-ci passent par une voie d'endocytose classique. Le LY294002 est principalement utilisé en biologie cellulaire comme inhibiteur de la PI3K, parce qu'il est plus stable en solution que la wortmannine (Walker et al, 2000). C'est pourquoi nous avons choisi cet inhibiteur et testé son effet sur l'efficacité de transfection des polycations. Il est à noter que cet inhibiteur est couramment utilisé dans le contexte général de l'endocytose mais il n'a jamais été utilisé pour des expériences de transfection.

La figure III.8 illustre les résultats d'une expérience de transfection réalisée en présence de concentrations croissantes de LY294002, avec des complexes SF/ADN, des complexes SEMO B64/ADN et des complexes MIWA A61 [SEMOB64/pCMV β].

Comme pour la cytochalasine, nous avons étudié l'influence du sérum sur l'effet du LY294002 en utilisant les complexes ternaires, en absence ou en présence de sérum.

Avant d'être déposés sur les cellules, les complexes sont dilués dans du DMEM avec ou sans sérum, auquel nous ajoutons le LY294002 à la concentration de 10 μ M, 25 μ M ou 50 μ M. Le LY294002 étant dilué dans du DMSO, nous ajoutons également la même quantité de DMSO pour les contrôles sans LY294002 (en noir).

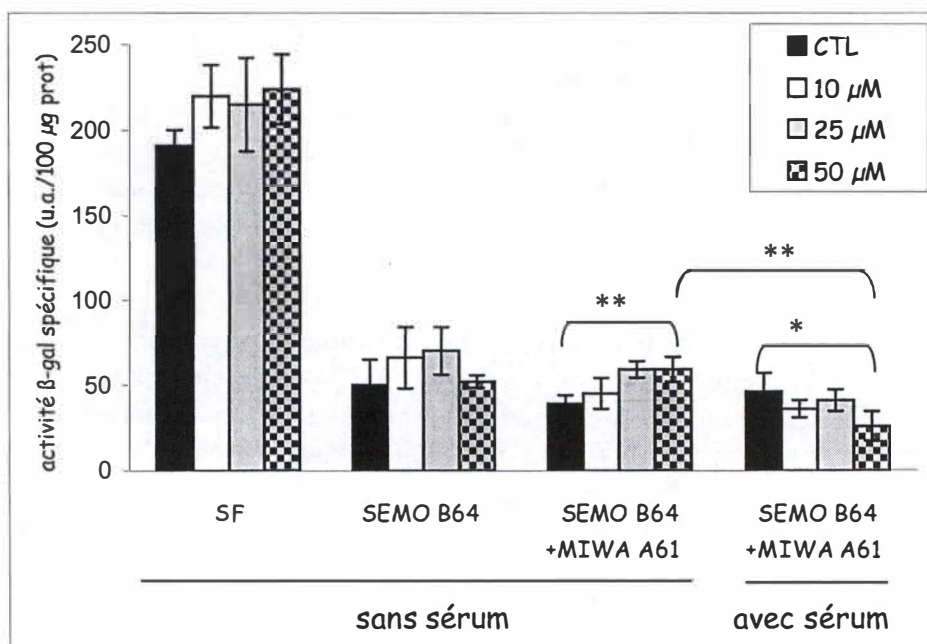


Figure III.8 Influence du LY294002 sur l'efficacité de transfection des cellules Cos-7 avec les complexes formés à partir de SEMO B64. Les cellules Cos-7, ensemencées à raison de 20 000 cellules/puits, sont transfectées avec les complexes SF/pCMV β (6/1, w/w) ou les complexes SEMO B64 (2/1, w/w), en absence de sérum. Les cellules sont également transfectées avec les complexes ternaires MIWA A61 [SEMO B64/pCMV β] (5/2/1, w/w/w), en absence ou en présence de sérum. La transfection est réalisée en absence ou en présence de concentrations croissantes de LY294002. Les résultats obtenus sont exprimés comme la moyenne $\pm$ DS (n = 3).

Les résultats reliés par une accolade sont significativement différents avec un $p = 0.05$ (*), $p = 0.01$ (**).

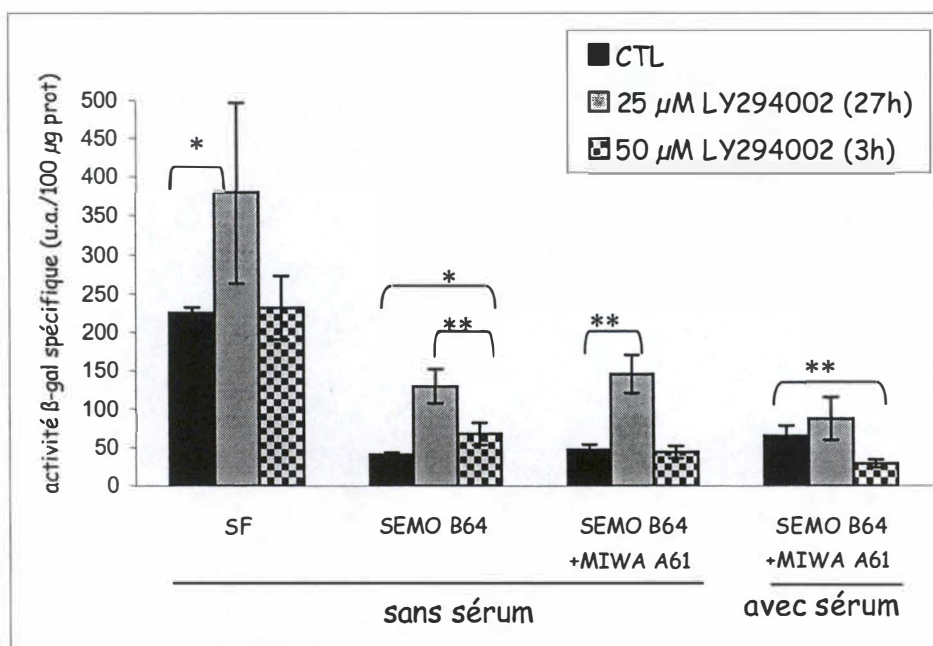


Figure III.9 Comparaison de l'effet du LY294002 sur l'efficacité de transfection des cellules Cos-7 avec des complexes formés à partir de SEMO B64, lors d'une application prolongée. Les cellules Cos-7 sont transfectées avec les complexes SF/pCMV β (6/1, w/w) ou les complexes SEMO B64 (2/1, w/w), en absence de sérum. Les cellules sont également transfectées avec les complexes ternaires MIWA A61 [SEMO B64/pCMV β] (5/2/1, w/w/w), en absence ou en présence de sérum. Le LY294002 est soit appliqué à une concentration de 50 μ M durant les 3 h de transfection ou soit appliqué à une concentration de 25 μ M pendant 27 h. Les résultats obtenus sont exprimés comme la moyenne $\pm$ DS (n = 3).

Les résultats reliés par une accolade sont significativement différents avec un $p = 0.05$ (*), $p = 0.01$ (**), $p = 0.001$ (***) .

Le LY294002 est appliqué pendant les 3 h de transfection et le dosage de l'activité de la β -gal est réalisé 24 h plus tard par la méthode colorimétrique.

Nous n'observons pas d'effet significatif du LY294002 pour la transfection avec le SF ou le polymère SEMO B64 seul. En ce qui concerne les mélanges ternaires, le LY294002 influence de manière différente, la transfection réalisée en absence ou en présence de sérum : l'efficacité de la transfection des complexes ternaires réalisée en absence de sérum est significativement augmentée par le LY294002 à la concentration maximale (50 μ M) ; alors qu'elle est inhibée en présence de sérum.

Le LY294002 diminue la biomasse cellulaire de 20 à 25 % que ce soit dans les cellules non transfectées ou les cellules transfectées, et ce pour les différents polymères testés et pour les différentes concentrations en LY294002 testées.

Le LY294002 n'est pas un inhibiteur irréversible de la PI3K. Pendant la période de 24 h qui suit la transfection et où il n'y a plus de LY294002, la PI3K peut donc redevenir active et le trafic des endosomes reprendre normalement. Afin de résoudre ce problème, nous avons refait la même expérience, en appliquant le LY294002 jusqu'au dosage de l'activité β -gal, c'est-à-dire pendant 27 h. Dans cette condition, le LY294002 est utilisé à une concentration de 25 μ M pour essayer de limiter sa toxicité à plus long terme.

Néanmoins, nous avons observé une diminution de la biomasse plus élevée lorsque le LY294002 est appliqué pendant 27 h. Cette diminution est également différente selon les conditions testées :

- pour le SF, le LY294002 ne réduit la biomasse qu'en application prolongée, de 26 %,
- pour le SEMO B64 et les mélanges de polymères, le LY294002 réduit la biomasse de 53 ± 1 %, en application prolongée (25 μ M) et de 28 ± 1 % en application de 3 h (50 μ M).
- pour les mélanges de polymères en présence de sérum, le LY294002 ne réduit la biomasse qu'en application prolongée, de 38 %.

Lorsque le LY294002 est présent pendant les 3 h de transfection (figure III.9), contrairement à ce qui a été observé à la figure III.8, il n'a plus une action différente sur la transfection avec les complexes ternaires selon qu'elle est réalisée en absence ou en présence de sérum. Cet effet est donc probablement non relevant.

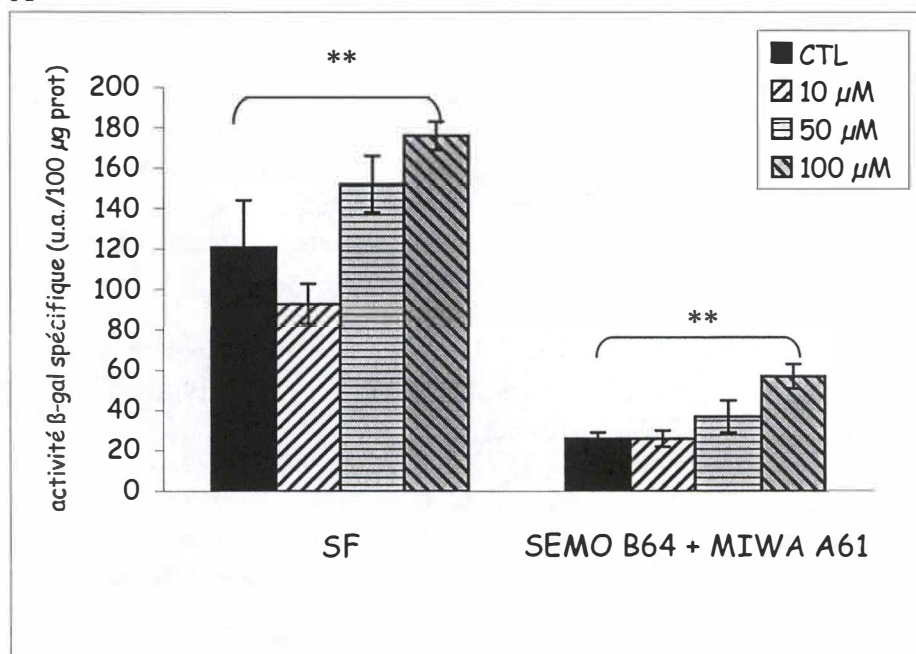
Lorsque le LY294002 est appliqué pendant 27 h, nous observons une augmentation significative de l'activité β -galactosidase pour les 3 polycations testés en absence de sérum, mais pas pour les complexes ternaires testés en présence de sérum.

Dans ce cas, comme pour la cytochalasine, le sérum influence l'effet de l'inhibiteur sur la transfection. En absence de sérum cet effet permet d'améliorer l'efficacité de transfection des polycations.

III.2.1.3 La chloroquine

Quel que soit le mode d'entrée des complexes dans les cellules, ceux-ci sont internalisés dans des vésicules d'endocytose et transportés jusqu'aux endosomes, qui vont progressivement subir un processus d'acidification jusqu'à la fusion avec les lysosomes. Comme décrit au point I.4.3, le taux de transfection élevé du PEI est lié à sa capacité à capturer les protons par un mécanisme d'«éponge à protons» qui permet aux complexes de sortir de l'endosome avant la fusion avec les lysosomes. D'autres polymères cationiques, comme la PLL, n'ont pas cette capacité intrinsèque et nécessitent l'ajout d'agents endosomolytiques tels que la chloroquine pour permettre une transfection efficace.

A



B

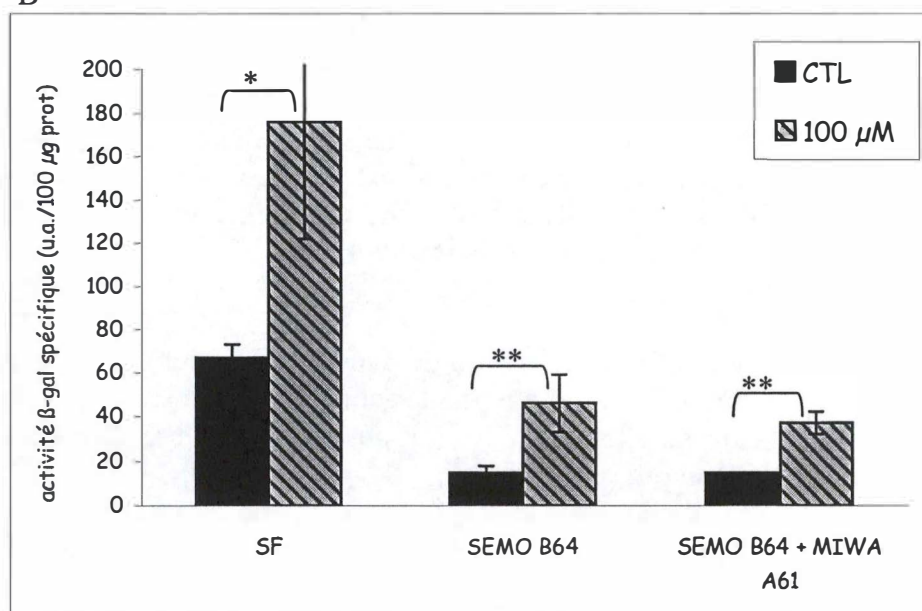


Figure III.10 Influence de la chloroquine sur l'efficacité de transfection des cellules Cos-7 avec les complexes formés à partir de SEMO B64. Les cellules Cos-7, ensemencées à raison de 20 000 cellules/puits, sont transfectées avec les complexes SF/pCMV β (6/1, w/w) ou les complexes SEMO B64/pCMV β (2/1, w/w), en absence de sérum. Les cellules sont également transfectées avec les complexes ternaires MIWA A61[SEMO B64/pCMV β] (5/2/1, w/w/w), en présence de sérum. A) La transfection est réalisée en absence ou en présence de concentrations croissantes en chloroquine. B) Seule la concentration de 100 μ M de chloroquine a été testée. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ DS (n = 3).

Les résultats reliés par une accolade sont significativement différents avec un $p = 0.05$ (*), $p = 0.01$ (**), $p = 0.001$ (***)

Cette base faible joue le rôle de « pompe à protons », ce qui a pour effet de déstabiliser la membrane suite au gonflement osmotique, facilitant par conséquence le relargage des complexes dans le cytosol.

Pour estimer la capacité intrinsèque des polymères de méthacrylate à sortir des endosomes, nous avons étudié l'effet de la chloroquine sur leur pouvoir transfectant. Nous avons testé différentes concentrations de chloroquine sur la transfection des cellules Cos-7 avec les complexes SF/pCMV β ou avec les complexes MIWA A61 [SEMOB64/pCMV β] (figure III.10A). Nous observons une amélioration significative de l'efficacité de transfection avec la chloroquine 100 μ M, et ce pour le SF et pour les polymères. Dans ces conditions, l'efficacité de transfection du SF est augmentée d'un facteur 2.1 ± 0.8 (moyenne $\pm$ écart type de 2 expériences indépendantes) et celle des complexes ternaires, est augmentée d'un facteur 2.4 ± 0.2 . L'efficacité de transfection des complexes formés à partir du polymère SEMO B64 seul, est augmentée d'un facteur 3 en présence de chloroquine 100 μ M (figure III.10B).

En comparaison, l'efficacité de transfection des complexes formés à partir de PLL est augmentée d'un facteur 30 en présence de chloroquine 100 μ M. Nous pouvons donc dire que les polymères possèdent bien une activité endosomolytique intrinsèque suffisante, et que l'ajout de chloroquine n'est pas indispensable, même si elle améliore encore leur pouvoir transfectant.

La chloroquine augmente également la toxicité des complexes SF/ADN de 33 % et celle des complexes ternaires et SEMO B64/ADN de 22 % et 11 %, respectivement.

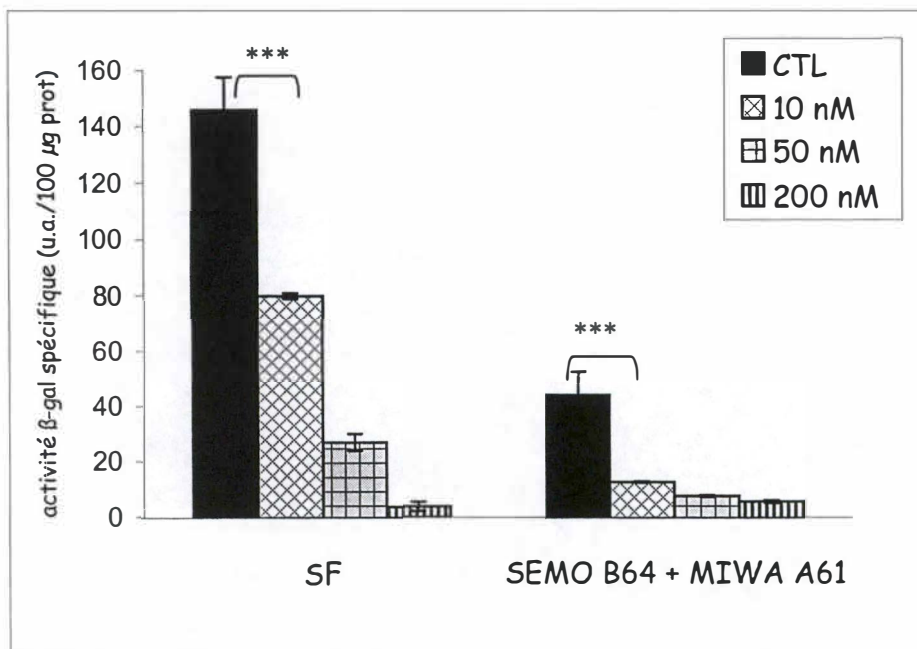
III.1.2.4 La bafilomycine A1

Nous émettons donc l'hypothèse que la capacité des polycations à sortir des endosomes est liée à leur pouvoir tampon. Cela signifie que l'inhibition de l'acidification des endosomes avec de la bafilomycine A1 par exemple (inhibiteur spécifique des pompes à protons vacuolaires), devrait provoquer une diminution significative de l'expression du transgène. De fait, la bafilomycine A1 inhibe la transfection avec des complexes à base de PEI (Kichler et al, 2001) ou de PLL (Midoux et Monsigny, 1999). Par contre, elle n'a aucun effet sur le pouvoir transfectant des lipides cationiques comme le DOTAP (Kichler et al, 2001). Nous avons donc étudié les effets de la bafilomycine A1 sur la transfection des cellules Cos-7 avec les polymères de méthacrylates (figure III.11).

Les cellules Cos-7 sont transfectées avec des complexes SF/pCMV β , avec des complexes SEMO B64/pCMV β et des complexes ternaires MIWA A61 [SEMOB64/pCMV β] en absence ou en présence de bafilomycine A1, ajoutée en même temps que les complexes pendant les 3 h de transfection. La bafilomycine étant diluée dans de l'éthanol (0.1 %), nous avons ajouté également la même quantité d'éthanol pour les contrôles sans bafilomycine et nous avons vérifié que l'éthanol n'avait pas d'effet sur l'efficacité de transfection des polymères (non montré).

En A, nous observons une inhibition concentration-dépendante de l'efficacité du SF et des complexes ternaires. Pour les polymères de méthacrylate, l'inhibition est pratiquement maximale pour une concentration de 10 μ M ; alors que pour le SF, l'inhibition est plus progressive. Les résultats suggèrent une plus grande sensibilité de l'efficacité de transfection des complexes ternaires à l'inhibition par la bafilomycine A1.

A



B

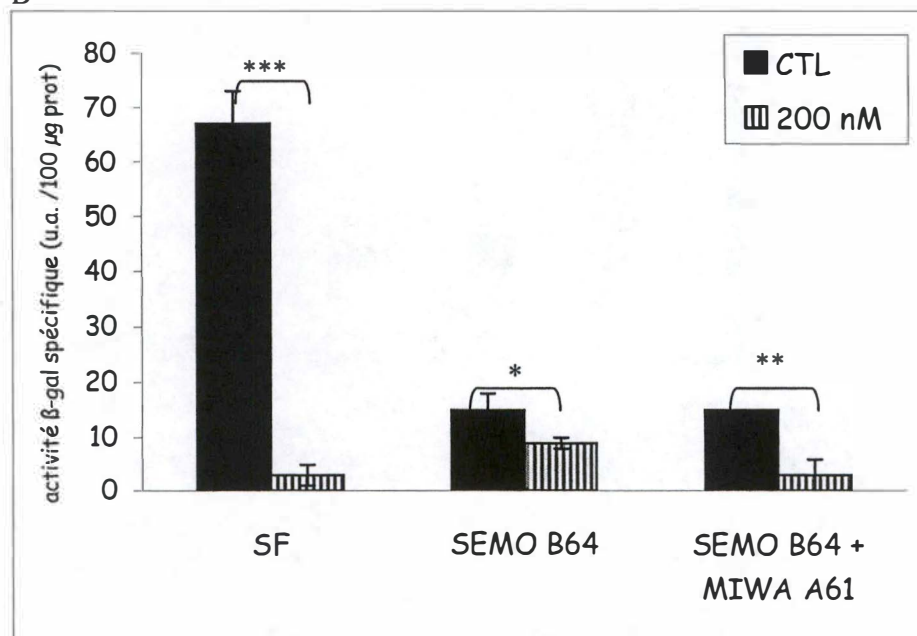


Figure III.11 Influence de la bafilomycine A1 sur le taux de transfection des cellules Cos-7 avec les complexes formés à partir de SEMO B64. Les cellules Cos-7, ensemencées à raison de 20 000 cellules/puits, sont transfectées avec les complexes SF/pCMV β (6/1, w/w) ou les complexes SEMO B64/pCMV β (2/1, w/w), en absence de sérum. Les cellules sont également transfectées avec les complexes ternaires MIWA A61 [SEMO B64/pCMV β] (5/2/1, w/w/w), en présence de sérum. A) La transfection est réalisée en absence ou en présence soit de concentrations croissantes de bafilomycine A1. B) Seule la concentration de 200 nM en bafilomycine A1 a été testée. Les résultats obtenus sont exprimés comme la moyenne $\pm$ DS (n = 3).

Les résultats reliés par une accolade sont significativement différents avec un p = 0.05 (*), p = 0.01 (**), p = 0.001 (***). * résultats significativement différents avec

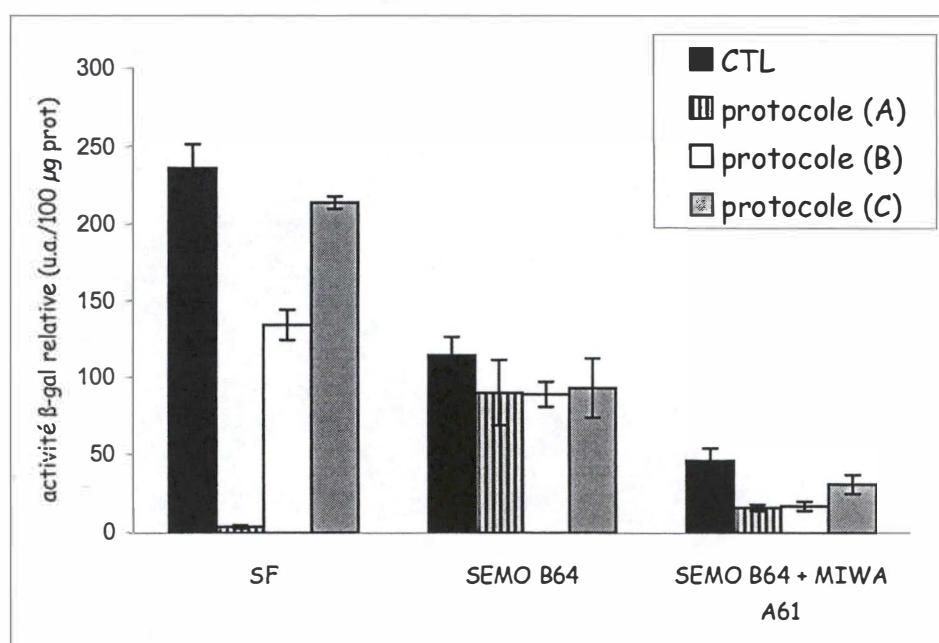
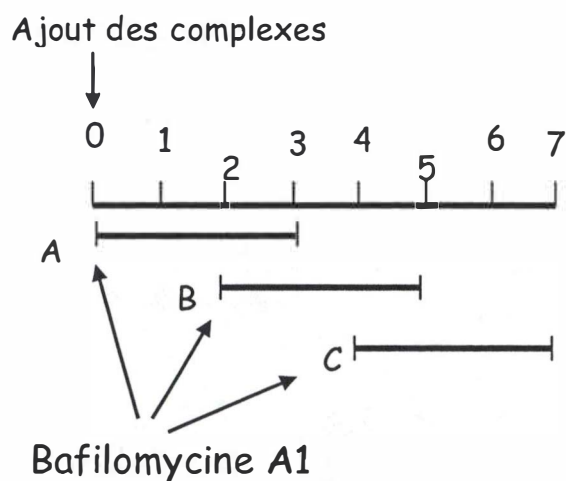


Figure III.12 Comparaison de l'effet de la bafilomycine A1 200 nM ajoutée à différents temps, sur l'efficacité de transfection. Les cellules Cos-7, ensemencées à raison de 20 000 cellules/puits, sont transfectées avec les complexes SF/pCMV β (6/1, w/w) ou les complexes SEMO B64/pCMV β (2/1, w/w), en absence de sérum; ou avec les complexes ternaires MIWA A61 [SEMO B64/pCMV β] (5/2/1, w/w/w), en présence de sérum. La transfection est réalisée en absence ou en présence de bafilomycine A1 200 nM pendant une période de 3 h comme décrit dans le schéma ci-dessus. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ DS (n = 3).

En présence de bafilomycine A1 200 nM, la diminution de l'efficacité de transfection est :

- de $97 \pm 1 \%$ pour le SF (moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences indépendantes),
- de $77 \pm 11\%$ pour les complexes ternaires ($n=3$),
- de $31 \pm 13\%$ pour le SEMO B64 ($n=2$).

Nous observons donc une inhibition nettement moins marquée pour le SEMO B64.

Ces résultats confirment bien que l'exposition des polyplexes à un environnement acide dans l'endosome est une condition requise pour permettre une transfection efficace. Ce qui indique que la protonation des groupements aminés (tertiaires), en milieu acide, est impliquée dans le processus de polyfection.

La bafilomycine A1 diminue la biomasse cellulaire de $\pm 25 \%$ que ce soit dans les cellules non transfectées ou les cellules transfectées, et ce avec chaque type de polycations testés.

Comme la bafilomycine A1 inhibe, du moins partiellement la sortie des polyplexes de l'endosome, nous avons utilisé cet agent dans le but de déterminer la cinétique de relargage des complexes à partir des vésicules d'endosomes. Cette expérience illustrée à la figure III.12, consiste à ajouter la bafilomycine A1 (à une concentration de 200 nM) à différents temps après le dépôt des complexes, et ceci pendant une période de 3 h. En présence d'éthanol (le solvant utilisé pour diluer la bafilomycine A1), l'efficacité de transfection des complexes n'était pas modifiée en comparaison avec les contrôles sans éthanol (non montré).

Quand la bafilomycine A1 est ajoutée en même temps que les complexes, l'efficacité de transfection du SF est inhibée de 98 %. Si elle est ajoutée 2 h après le dépôt des complexes, l'inhibition n'est plus que de 43 % et après 4 h, la bafilomycine n'a pratiquement plus d'effet sur l'efficacité de transfection. En présence de bafilomycine, l'efficacité de transfection du polymère SEMO B64 est réduite de 30 % pour toutes les conditions testées. L'efficacité de transfection du mélange de polymères SEMO B64/MIWA A61 est réduite de 65 % lorsque la bafilomycine est présente en début de transfection (lorsqu'elle est ajoutée en même temps que les complexes ou 2 h après). L'efficacité de transfection n'est plus réduite que de 33 % quand la bafilomycine A1 est ajoutée 4 h après le début de la transfection.

Ces résultats suggèrent que la sortie des complexes SF/ADN des endosomes doit se produire plus rapidement que pour les complexes formés à partir des polymères de méthacrylate. Pour ces derniers, la cinétique est également différente : le processus de relargage des complexes SEMO B64/ADN semble plus étalé dans le temps que la sortie des complexes ternaires.

Au terme de cette première approche, nous pouvons tirer les premières conclusions

III.2.1.5 Discussion

Au cours de ce premier volet, nous avons donc utilisé différents agents qui interfèrent avec certaines étapes de l'endocytose. Nous avons voulu voir s'ils modulaient d'une manière ou d'une autre l'efficacité de transfection des 3 types de polymères que sont le SF, le polymère SEMO B64 et les mélanges de polymères SEMO B64/MIWA A61.

Les molécules chimiques ont été choisies pour agir

- au niveau de l'**actine** (cytochalasine B) : nécessaire à la formation et au déplacement des vésicules dans le cytoplasme.
- au niveau de la **PI3K** (LY294002) intervenant dans le phénomène de fusion entre les endosomes pour former les corps multivésiculaires.
- Au niveau de l'**acidification des endosomes** (chloroquine et bafilomycine), étape incontournable dans la fusion avec le lysosome.

L'inhibition de la polymérisation des microfilaments d'actine par la **cytochalasine B** a des effets surprenants au niveau de la transfection.

D'une part, cet inhibiteur semble modifier différemment l'efficacité de transfection des 3 types de polycations testés :

- il n'a pas d'effet sur l'efficacité de transfection du SF,
- il a tendance à améliorer celle du SEMO B64,
- et enfin, il inhibe l'efficacité des mélanges ternaires.

(avec une variabilité des résultats observée plus particulièrement pour le polymère SEMO B64).

D'autre part, l'effet de la cytochalasine B est clairement influencé par la présence de sérum : l'action inhibitrice sur l'efficacité de transfection des complexes ternaires (utilisés en présence de sérum) ne s'observe plus lorsque la transfection est réalisée en absence de sérum. Dans ce cas, le traitement à la cytochalasine permet même d'augmenter l'efficacité de transfection tout comme c'est observé avec le polymère SEMO B64.

Le type de polycations (qui diffèrent en composition, en taille), mais également l'environnement dans lequel les cellules Cos-7 se trouve pendant la transfection semblent donc influencer l'action de la cytochalasine sur l'efficacité de transfection *in vitro*.

Nous avons essayé de confronter nos résultats avec les données de la littérature. Le traitement avec la cytochalasine B réduit l'internalisation des complexes lipidiques de 50 % et inhibe fortement l'efficacité de transfection des lipides cationiques de type DOTAP (Zelphati et Szoka, 1996), ce qui suggère que la voie principale de transport de ces lipides est l'endocytose. Néanmoins nous n'avons aucune donnée à ce jour concernant les polymères, car à notre connaissance, cet inhibiteur n'a jamais été testé sur l'efficacité de transfection des polymères cationiques.

En l'utilisant avec les polymères de méthacrylate, nous ne nous attendions pas à observer une augmentation de leur efficacité de transfection, en absence de sérum. Nous n'avons actuellement pas d'explications satisfaisante à apporter à ces résultats, d'autant plus que les cytochalasine sont considérées comme des molécules plutôt spécifiques.

Nous avons également utilisé le **LY294002** pour inhiber spécifiquement la PI3K. Cet inhibiteur n'a pas d'effet sur l'efficacité de transfection des différents polycations, lorsqu'il est appliqué uniquement pendant les 3 h de transfection, ce qui peut être expliqué par son activité réversible. Le traitement au LY294002 est couramment utilisé pour étudier le rôle de l'endocytose, mais il n'a jamais été testé en transfection. Son effet sur l'endocytose est généralement mesuré juste après son application, alors que dans notre cas, l'efficacité de

transfection n'est révélée que le lendemain. Ce qui laisse le temps à la PI3K de retrouver une activité normale. C'est pourquoi nous l'avons appliqué depuis la transfection jusqu'à la révélation de l'activité β -gal (pendant 27 h). En absence de sérum, nous observons une augmentation de l'efficacité de transfection, pour tous les polymères testés. Etant donné que le LY294002 inhibe la PI3K, ayant un rôle dans le trafic et la fusion des endosomes pour former les corps multivésiculaires, cette inhibition pourrait altérer et retarder le transport vers le lysosome, permettant de ce fait :

- d'éviter la dégradation enzymatique des complexes,
 - d'augmenter les chances de sortie des complexes de l'endosome,
- ce qui pourrait expliquer l'augmentation d'efficacité de transfection.

En présence de sérum, la tendance est inversée comme dans le cas de la cytochalasine, c'est-à-dire que le LY294002 entraîne une diminution de l'efficacité de transfection des complexes ternaires testés. Nous proposons l'hypothèse que les protéines sériques pourraient peut-être modifier ou empêcher l'action inhibitrice du LY294002 sur la PI3K.

Nous avons choisi le LY294002 pour sa plus grande spécificité vis-à-vis de la PI3K, mais il serait peut-être préférable de tester un inhibiteur irréversible de la PI3K, tel que la wortmannine afin d'éclaircir les résultats. Cela permettrait d'assurer une inhibition irréversible de l'enzyme, tout en réduisant le temps d'application et de ce fait la toxicité.

Le traitement à la **bafilomycine A1** (inhibiteur spécifique des V-ATPases) a montré une inhibition totale pour le SF et partielle pour les polymères de méthacrylate. Ce qui signifie que l'entrée de protons lors de l'acidification est un événement crucial pour permettre la sortie des complexes de l'endosome. La capacité du SF et des polymères de méthacrylate d'assurer le relargage des polyplexes dans le cytoplasme serait donc liée à leur pouvoir tampon. Selon l'hypothèse de Berh, ils agiraient donc via un mécanisme « éponge à proton » (Boussif et al, 1995). La différence entre les PEI et les polymères de méthacrylate est que l'effet décrit pour les PEI est attribué aux amines primaires, secondaires et tertiaires, alors que les polymères de poly (MADAM) ne contiennent que des amines tertiaires, ce qui réduit leur capacité de capturer les protons lors de l'acidification des endosomes (Rungsardthong et al, 2001). Le SF possède quant à lui des fonctions amines, primaires en surface et tertiaires à l'intérieur, partiellement protonées à pH 7 (Merdan et al, 2002). Ces fonctions dont le rôle est respectivement de condenser l'ADN et de neutraliser l'acidification des endosomes, confèrent au SF un pouvoir tampon dans une gamme de pH plus large que pour les P(MADAM). Cette plus grande capacité de protonation peut expliquer l'inhibition progressive de l'efficacité de transfection du SF en fonction de la concentration de bafilomycine ajoutée. Alors que le P(MADAM) dont les groupements se protonent à pH plus acide, semble plus sensible que le SF à la bafilomycine A1 (10 nM).

Le fait qu'en présence de bafilomycine A1, l'efficacité de transfection du polymère SMO B64 est encore relativement élevée, pourrait être dû à une inhibition incomplète de l'acidification. Mais au regard des résultats obtenus dans les autres conditions, cette possibilité semble peu probable. Une autre hypothèse proposée est que le pouvoir transfectant du SMO B64 n'est peut être pas uniquement dû à son activité endosomolytique. En effet, dans le cas du PEI, il a été récemment rapporté qu'il pouvait également faciliter l'import nucléaire de l'ADN (Pollard et al, 1998).

L'effet de la bafilomycine dépend du type de polycations, mais aussi du type de cellule utilisé. En effet, Kichler et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition de l'efficacité de transfection du PEI, en présence de bafilomycine A1 (175 nM) varie de 7 à 74 fois selon le type cellulaire utilisé (Kichler et al, 2001). Il a été montré également que l'efficacité de

transfection du PEI est hautement dépendante de la quantité de polyplexes appliquée aux cellules. Cela suggère que l'effet « éponge à protons » devient efficace pour disrupter les endosomes uniquement si la concentration de polymères, après internalisation dans les vésicules acides, est suffisante (Kichler et al, 2001).

Enfin, l'effet « éponge à protons » du PEI, entraînant le gonflement osmotique et donc la déstabilisation membranaire, peut aussi dépendre du type cellulaire (un comportement qui peut être influencé par les différences dans la nature et l'activité des pompes à protons) et semble être plus difficile à réaliser dans les fibroblastes murins L929 que dans les cellules endothéliales E.A.hy 926 (Rémy-Kristensen et al, 2001).

L'ajout de bafilomycine A1 à différents temps post-transfection a permis de montrer que les cinétiques de sortie des complexes de l'endosome varient selon le type de polycation utilisé :

- pour les complexes SF/ADN, ce processus est très rapide et progressif. Environ la moitié des complexes sortent des endosomes durant les 2 premières heures suivant la transfection et pratiquement le processus est pratiquement achevé 4 h après l'ajout des complexes,
- pour les complexes SEMO B64/ADN, l'efficacité de transfection est moins affectée que pour les autres polycations. Cette inhibition plus faible en présence de bafilomycine reste constante pour les différents protocoles réalisés.
- pour les complexes ternaires, ce processus est plus étalé dans le temps. En effet, la moitié des complexes est libérée dans le cytoplasme 4 h après le dépôt des ceux-ci sur les cellules.

Le PEI, possède un caractère endosomolytique intrinsèque et la sortie de l'endosome des complexes PEI/ADN est rapide car le traitement avec la bafilomycine A1, 4 h après transfection, n'altère pas l'efficacité de transfection (Kichler et al, 2001). Le SF montre les mêmes résultats, ce qui confirme que cette sortie rapide des complexes de l'endosome est liée à son pouvoir endosomolytique, qui fait de cet agent un bon vecteur de transfection.

Le processus est donc plus lent pour les polymères de méthacrylates. Ces résultats nous ont permis de mieux cibler une plage horaire pour étudier le cheminement intracellulaire des complexes ternaires via la microscopie confocale, comme nous le verrons au point III.2.2..

La **chloroquine** est une molécule endosomolytique couramment utilisée pour améliorer l'efficacité de transfection des polymères synthétiques, incapables d'assurer la sortie des complexes de l'endosome comme par exemple, les PLL. Nous avons testé son effet sur l'efficacité de transfection des polymères de méthacrylate afin de voir s'il était possible d'améliorer la sortie des polyplexes de l'endosome. La légère amélioration de l'efficacité de transfection observées pour les 3 types de polycations testés est de l'ordre de 1.5 fois pour le SF et de 2-3 fois pour les polymères de méthacrylate. Comme déjà mentionné, la chloroquine peut augmenter de 30 fois le taux de transfection des PLL (Choi et al, 1998). Ces résultats suggèrent que les polymères de méthacrylate sont suffisamment armés pour assurer la sortie des complexes de l'endosome et donc permettre une transfection efficace sans ajout de chloroquine.

Cette capacité endosomolytique intrinsèque est directement liée à la protonation des amines tertiaires à pH acide. Une stratégie envisagée pour augmenter le nombre de charges positives portées par le polymère est la quaternisation. Il a été montré au laboratoire que ces P(MADAM) quaternisés étaient de bons agents de complexation, mais de mauvais agents de transfection. En effet, dans ce cas, les groupements amines n'ont plus la possibilité de se protoner à pH acide et sont donc incapable d'agir par effet « pompe à protons », pour déstabiliser les membranes et faciliter la sortie des complexes de l'endosome.

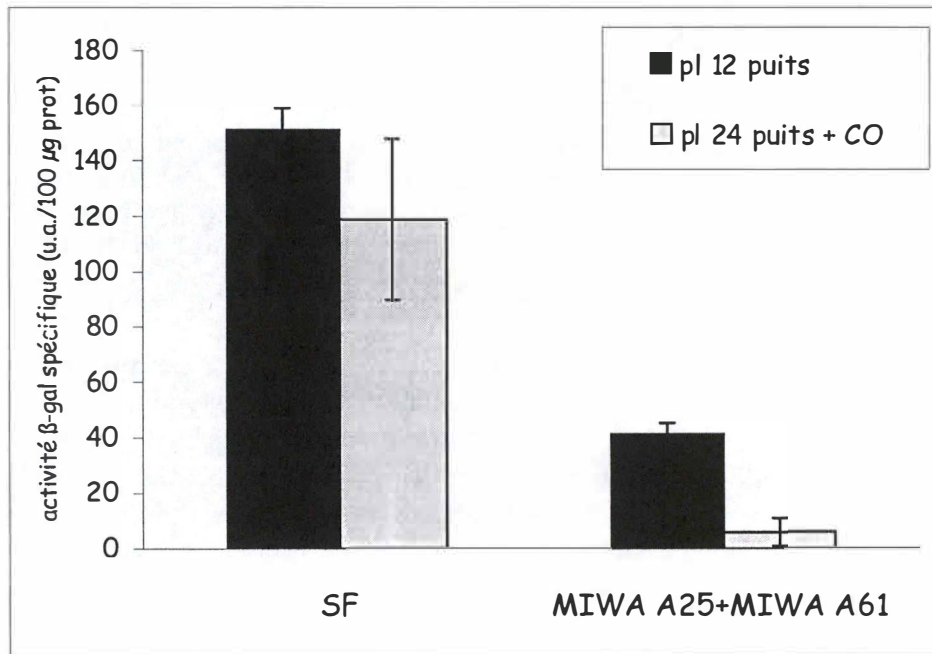


Figure III.13 Effet du support (plastique-verre) sur l'efficacité de transfection des cellules Cos-7 avec les complexes ternaires MIWA A61[MIWA A25/pCMVB]. Les cellules sontensemencées à raison de 20 000 cellules/puits, soit dans des plaques à 12 puits, soit dans des plaques à 24 puits munies des couvre-objets (CO). La transfection est réalisée avec des complexes SF/ADN (6/1, w/w) ou des complexes ternaires MIWA A61[MIWA A25/pCMVB] (5/2/1, w/w/w). La même quantité d'ADNp (1 μ g /puits) a été engagée pour les deux conditions testées. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ DS (n=3).

Enfin, rappelons que l'effet « éponge à protons » des PEI et le gonflement osmotique qu'il entraîne peut dépendre du type cellulaire (Rémy-Kristensen et al, 2001). Forrest et ses collaborateurs ont également montré que l'effet de la chloroquine peut varier selon le type cellulaire utilisé et même dans certains cas avoir des effets opposés selon le type de vecteur utilisé (PLL ou PEI) (Forrest et al, 2002).

III.2.2 Etude du cheminement intracellulaire des complexes marqués via la microscopie confocale.

La seconde partie de ce travail consiste à étudier le rôle de l'endocytose lors de la transfection des cellules Cos-7, non plus comme précédemment en agissant à divers niveaux de cette voie, mais en suivant le cheminement intracellulaire des complexes marqués en microscopie confocale. Cette approche a été réalisée en utilisant de l'ADN rendu préalablement fluorescent avec une molécule intercalante (YOYO-1), avant la formation des complexes de transfection. Par la technique d'immunocytochimie, nous avons ensuite marqué les compartiments intracellulaires impliqués dans les étapes précoces du processus d'endocytose (décrit au point I.6), que sont les endosomes précoces et les endosomes tardifs, ainsi que le noyau qui est la dernière étape limitante pour une transfection efficace. Ceci, afin de pouvoir mettre en évidence une colocalisation éventuelle avec les complexes marqués. Peu d'études ont permis de visualiser des complexes dans le noyau, et pour la plupart, les résultats restent ambigus. En effet, les images de colocalisation complexes-noyau montrées dans la littérature sont généralement limitées au seul plan XY de la cellule et ne permettent pas d'affirmer de manière sûre que les complexes observés sont bien présents dans le noyau et non au dessus ou en dessous de celui-ci. L'intérêt d'utiliser le microscope confocal est de pouvoir visualiser de manière non ambiguë les complexes marqués dans les différents compartiments étudiés.

III.2.2.1 Transfection des cellules Cos-7 sur un support en verre

Le premier problème qui s'est posé, est que pour réaliser cette étude en microscopie confocale, il faut impérativement travailler avec des cellulesensemencées sur des lames de verre. Or, jusqu'à présent, les expériences de transfection ont toujours été réalisées avec des cellules Cos-7ensemencées dans des plaques à 12 puits en plastique. La surface de ces puits est de 3.8 cm². Celle des couvre-objet de verre (CO) est de l'ordre de 1.5 cm², ceux-ci étant placés dans des plaques à 24 puits. Sachant que les cellules ne se comportent pas de la même manière sur ces deux types de support, ni même dans les deux types de puits, nous avons vérifié que les paramètres optimisés précédemment étaient applicables aux cellules cultivées sur lamelles de verre.

Nous tenons à faire remarquer que le polymère utilisé lors de ces mises au point pour la transfection, est le polymère MIWA A25, étant donné que celles-ci ont été réalisées avant même de recevoir le polymère SEMO B64 avec lequel nous avons travaillé par la suite.

Pour vérifier que nous pouvons transfecter les cellules sur lamelles de verre, nous avons testé les polymères sur des cellules cultivées sur les deux types de support en parallèle.

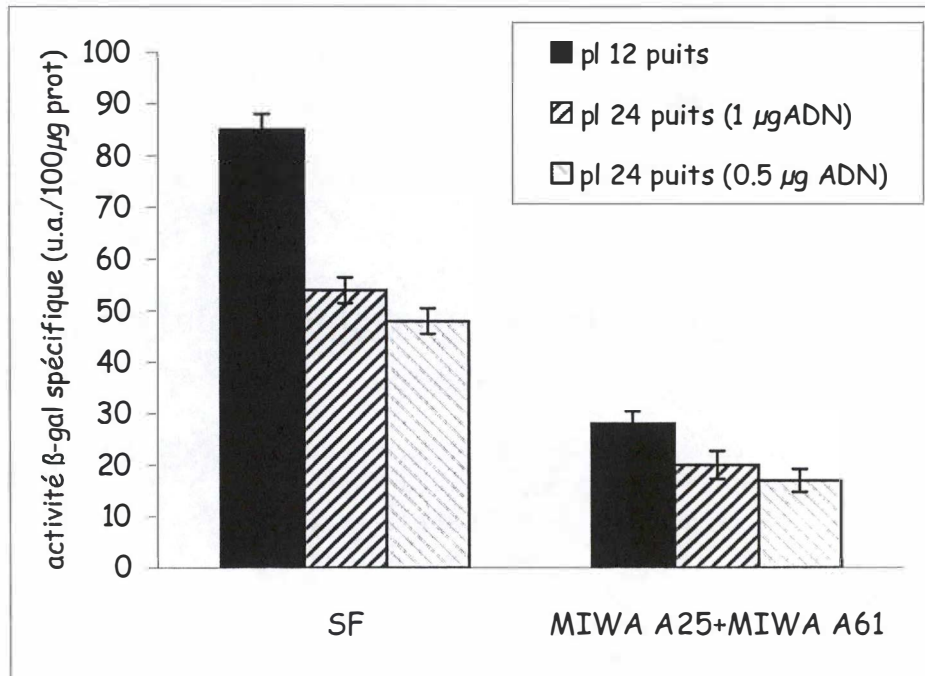


figure III.14 Comparaison de l'efficacité de transfection des cellules Cos-7 avec les complexes ternaires MIWA A61[MIWA A25/pCMVβ], selon le type de support utilisé, la densité cellulaire et la quantité d'ADN engagée. Les cellules Cos-7 sont ensemencées à raison de 20 000 cellules/puits dans des plaques à 12 puits et 10 000 cellules/puits dans des plaques à 24 puits + CO . Les cellules sont transfectées avec des complexes SF/pCMVβ (6/1, w/w), en absence de sérum ou avec les complexes ternaires MIWA A61[MIWA A25/pCMVβ] (2/5/1, w/w/w), en présence de sérum. Pour les plaques à 12 puits, 1 μg d'ADNp est engagé alors que pour les plaques à 24 puits, deux conditions sont testées : 1 μg ou 0,5 μg d'ADNp engagé. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ DS (n=3).

Cette expérience, illustrée à figure III.13, a été réalisée selon les mêmes conditions de transfection que celles utilisées précédemment, c'est-à-dire que les cellules Cos-7 ont été ensemencées à raison de 20 000 cellules/puits dans :

- des plaques 12 puits en plastique.
- des plaques 24 puits munies de couvre-objet en verre.

Nous avons choisi de travailler avec le même nombre de cellules dans les deux conditions malgré la différence de superficie, car il est connu que les cellules cultivées sur verre prolifèrent moins vite.

Les cellules ont été transfectées le lendemain, avec des complexes SF/pCMV β (6/1, w/w) en absence de sérum ou avec des complexes ternaires MIWA A61 [MIWA A25/pCMV β] (5/2/1, w/w/w) en présence de sérum. La même quantité d'ADN (1 μ g/puits) a été engagée dans les deux types de plaques.

Nous observons une diminution de l'efficacité de transfection des cellules cultivées sur couvre-objet avec les deux types de complexes testés. Cependant, cette diminution est plus marquée pour les complexes ternaires (± 85 %) que pour les complexes formés à partir du SF (± 21 %). Nous avons également estimé le nombre de cellules en fin d'expérience par une mesure de la biomasse. Curieusement, nous détectons deux fois moins de protéines pour les cellules dans la plaque à 24 puits + CO, que pour les autres puits, même pour les cellules non transfectées (non montré). Deux explications sont possibles :

- le verre ne convient absolument pas aux cellules Cos-7, ce qui est peu probable,
- contrairement à notre idée de départ, 20 000 cellules/puits représente une densité d'ensemencement trop élevée pour les plaques à 24 puits, les cellules deviennent trop confluentes et meurent.

Pour vérifier cette seconde hypothèse, nous avons refait l'expérience en adaptant le nombre de cellules ensemencées à la superficie des puits pour nous trouver dans les mêmes conditions de densité cellulaire avant transfection dans les deux types de plaques. Afin de limiter l'effet toxique des complexes, nous avons également adapté la quantité d'ADN engagé dans les puits munis de couvre-objet pour garder le même rapport ADN/densité cellulaire.

En résumé :

- dans les plaques 12 puits en plastique, les cellules Cos-7 sont ensemencées à raison de 20 000 cellules/puits. Elles sont transfectées le lendemain par les complexes comme précédemment, avec 1 μ g d'ADNp/puits.
- dans les plaques 24 puits + CO, les cellules Cos-7 sont ensemencées à raison de 10 000 cellules/puits. Elles sont transfectées par les complexes, avec soit :
 - 1 μ g d'ADNp par puits.
 - 0.5 μ g d'ADNp par puits.

Dans ces conditions, la mesure de la biomasse des cellules transfectées ou non, donne des résultats proportionnels entre les plaques à 12 et à 24 puits : par exemple, nous obtenons respectivement 35 ± 4 μ g et 18 ± 2 μ g de protéines pour les cellules non transfectées.

Les résultats obtenus en transfection sont illustrés dans la figure III.14. Nous observons toujours une efficacité de transfection moindre avec les cellules cultivées sur le verre. Dans ce cas-ci, la réduction de l'activité β -gal est de l'ordre de 40 % pour le SF et de 34 % pour les polymères. Le fait d'engager 1 μ g d'ADNp n'a pratiquement pas d'effet bénéfique sur l'efficacité de transfection des complexes ternaires. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler avec des cellules Cos-7 ensemencées à raison 10 000 cellules/puits et de les transfecter avec 0.5 μ g d'ADN/puits pour la suite de ce travail.

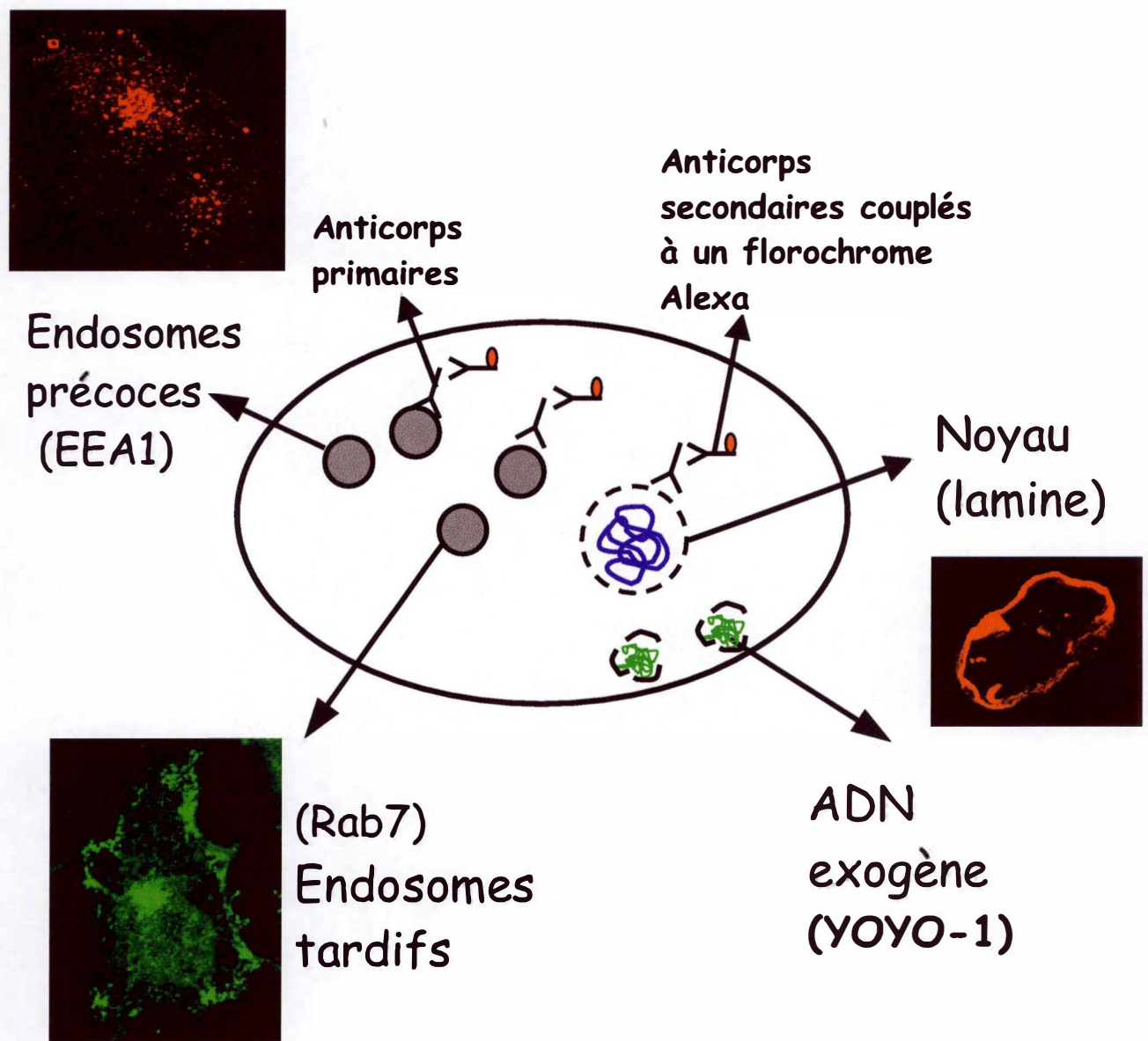


Figure III.15 Présentation des divers marquages réalisés avec des cellules Cos-7.

La révélation de la lamine B et de la protéine EEA1 est réalisée avec des anticorps secondaires couplés avec un fluorochrome Alexa 568 (émet dans le rouge). Les anticorps secondaires dirigés contre les anti-Rab7 sont couplés à un fluorochrome Alexa 488 (émet dans le vert). Les agrandissements ne sont pas identiques pour les 3 micrographies.

Enfin, nous avons vérifié que l'activité β -gal détectée dans cette expérience correspondait à un nombre de cellules transfectées suffisant pour permettre l'observation intracellulaire des complexes marqués au microscope confocal. Nous avons donc déterminé le pourcentage de cellules transfectées par le test histochimique. Cette expérience a été réalisée avec le polymère SEMO B64 utilisé par la suite. La révélation histochimique de l'expression de la β -galactosidase est réalisée 24 h après la transfection, comme décrite au point II.4.3. Nous observons 2.9 ± 1.5 % de cellules transfectées, ce qui correspond à plus ou moins 8 cellules bleues par champ examiné au microscope, avec l'objectif X10.

III.2.2.2 Mises au point des divers marquages

Les problèmes sur lames de verre une fois réglés, il nous restait encore à mettre au point les différents marquages requis pour visualiser :

- les complexes ternaires au sein des cellules Cos-7, après transfection.
- les différents compartiments intracellulaires pour suivre le cheminement des polyplexes marqués au cours du temps.

Deux approches sont décrites dans la littérature pour marquer les polyplexes : soit marquer l'ADNp (par exemple avec une molécule intercalante comme le YOYO-1), soit greffer de manière covalente une sonde fluorescente sur le polymère (par exemple, la fluorescéine ou FITC) (Rémy-Kristensen et al, 2001). Cela permet de suivre séparément l'ADN et le polymère et de localiser l'étape de dissociation entre le polymère et l'ADN.

Dans notre cas, nous avons travaillé uniquement avec de l'ADN (pCMV β) marqué au YOYO-1 pour la simple raison que le polymère de méthacrylate marqué n'est pas encore disponible, mais sa synthèse est en cours à l'UMH. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du YOYO-1 sont respectivement de 491 et 509 nm, les complexes sont donc détectés en vert.

Nous avons testé plusieurs conditions pour le marquage de l'ADN avec le YOYO-1 en jouant sur le rapport YOYO-1/ADN (1 molécule de YOYO-1 pour 200 ou 300 paires de base (pb)), ainsi que sur le temps d'incubation pour le marquage (30 et 60 min). Nous avons observé qu'une molécule de YOYO-1/300 pb convenait pour l'étude du cheminement des complexes aux temps longs, alors qu'aux temps courts l'ADN est trop faiblement marqué. Nous avons donc opté pour l'utilisation d'une molécule de YOYO-1 pour 200 pb pour nous placer dans les meilleures conditions possibles. De même, une incubation de 60 minutes donne des complexes nettement plus fluorescents. Cette période d'incubation ainsi que les étapes de transfection sont réalisées à l'obscurité pour préserver au maximum les fluorochromes du bleaching, c'est-à-dire de la perte de fluorescence des fluorochromes quand ceux-ci sont exposés à la lumière.

Pour marquer les différents compartiments intracellulaires, nous avons utilisé des anticorps qui reconnaissent des protéines membranaires spécifiques de ceux-ci (figure III.15), c'est-à-dire :

- la protéine **EEA1** (Early Endosome Antigen-1), qui est une protéine cytosolique recrutée en membrane des **endosomes précoces**.
- la protéine **Rab7** qui fait partie de la famille des protéines Rab, des petites protéines G à activité GTPase. Elles s'associent spécifiquement aux membranes endosomales et leur rôle est de réguler le transport membranaire et de faciliter la fusion endosomale. Rab4 et Rab5 sont localisées au niveau des endosomes précoces ; Rab7 et Rab9 sont spécifiques des **endosomes tardifs**.
- la **lamine B** qui est une protéine faisant partie du réseau de la lamina nucléaire permettant de localiser le **noyau**.

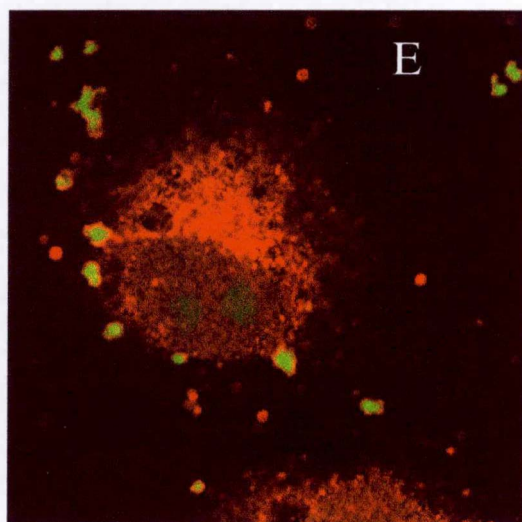
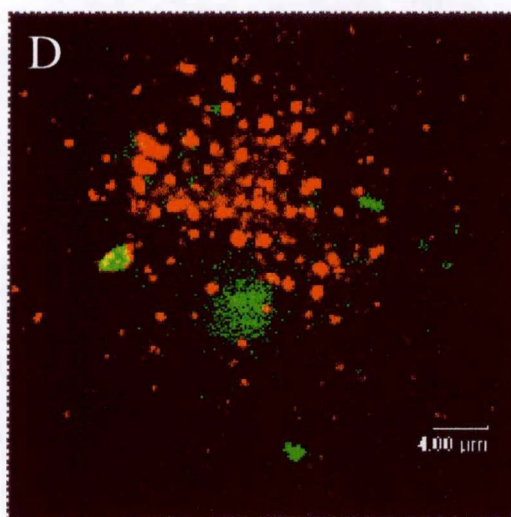
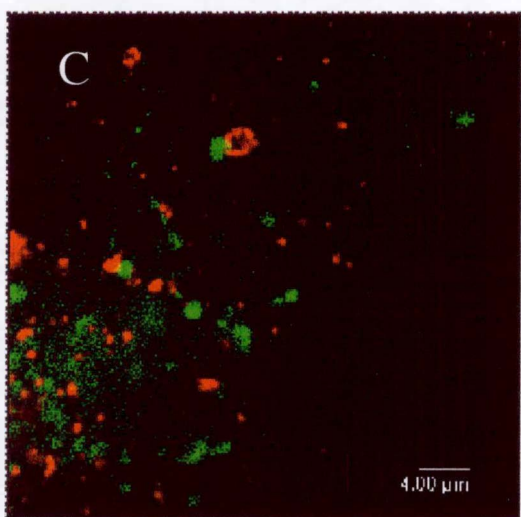
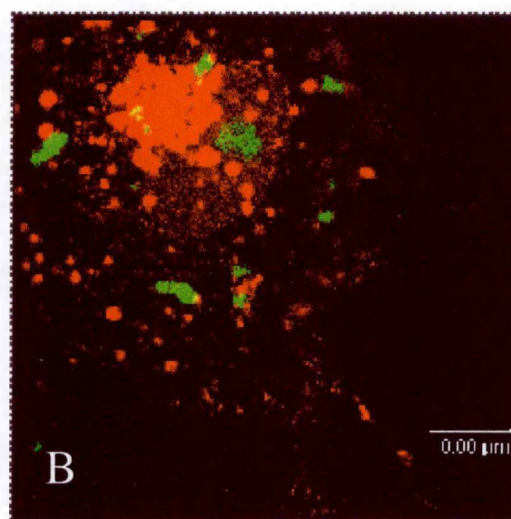
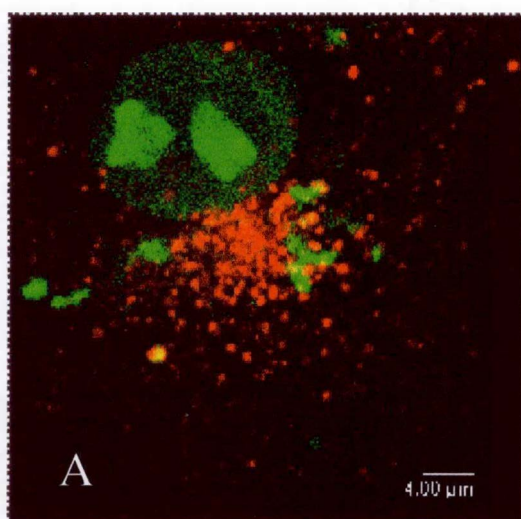


Figure III.16 Micrographies de cellules Cos-7 transfectées avec les complexes ternaires MIWA A61[SEMO B64/pCMVβ-YOYO] après marquage des protéines EEA1 et analyse au microscope confocal.

En vert, l'ADNp des complexes. En rouge, les endosomes précoces. Ces images sont prises à 1 h (A), 2 h (B), 3 h (C) et 4 h (D) après le dépôt des complexes sur les cellules.

(E) Marquage des protéines EEA1 après transfection des cellules avec des complexes MIWA A35/pCMVβ (issu du mémoire de Delphine François, 2002)

Ces compartiments sont ensuite repérés à l'aide d'anticorps secondaires dirigés contre les anticorps primaires spécifiques et couplés à un fluorochrome Alexa 488 ou 568 (excités à une longueur d'onde de 488 ou 568 nm et détectés respectivement en vert ou en rouge) selon les besoins.

Nous avons vérifié dans un premier temps que ces anticorps permettaient bien de distinguer clairement chaque compartiment dans des cellules contrôles non transfectées et nous avons testé différentes concentrations en anticorps pour déterminer les conditions optimales. La figure III.15 illustre les images obtenues avec les 3 anticorps.

Nous observons une sorte de réseau dans toute la cellule pour le marquage des endosomes tardifs alors que le marquage des endosomes précoces est plus ponctué et localisé au centre de la cellule. De temps en temps des vésicules plus grandes sont détectables. Par un double marquage des protéines EEA1 et Rab7, nous avons vérifié que ces protéines sont localisées sur des vésicules distinctes (non montré). Le marquage de la lamine nous permet d'obtenir un beau liseré délimitant le noyau, avec des replis de la membrane nucléaire pour certaines cellules.

III.2.2.3 Transfection des cellules Cos-7 avec les complexes ternaires MIWA A61 [SEMO B64/pCMV β] et marquage des endosomes précoces et tardifs.

Après avoir réalisé toutes ces mises au point, nous sommes en mesure d'entamer l'étude du cheminement des complexes ternaires préparés comme décrit au point II.7.3, avec de l'ADNp préalablement marqué, après transfection des cellules Cos-7 en présence de sérum. Toutes les heures après l'ajout des complexes, les cellules sont fixées afin de visualiser l'internalisation des complexes au cours du temps. Au vu des résultats obtenus avec la bafilomycine A1 (inhibiteur des V-ATPases à H^+) (voir figure III.12) qui montrent que la sortie des complexes des endosomes est un processus étalé dans le temps, nous avons balayé une plage horaire étendue, c'est-à-dire de 15 minutes à 9 h après l'ajout des complexes aux cellules. Le marquage des endosomes précoces ou tardifs est ensuite réalisé comme décrit au point II.7.3. Les protéines EEA1 ou Rab7 sont visualisées en rouge et l'ADN des complexes en vert.

De manière générale, peu de complexes sont visibles jusqu'à 1 heure, ensuite le nombre de complexes dans la cellule augmente au cours du temps. De plus, ces complexes sont énormes, ils font jusqu'à plusieurs microns. Nous reviendrons sur ce point un peu plus tard.

Les images obtenues avec le marquage des endosomes précoces sont illustrées à la figure III.16. Nous observons une localisation périnucléaire très dense des endosomes précoces (EEA1) avec quelques complexes détectables autour de la cellule après 1 h. Après 2 h, nous observons des complexes au sein de la cellule. Certains sont très proches des endosomes précoces, parfois accolés à ceux-ci, mais jamais nous n'avons vu de complexes entourés d'un liseré rouge suggérant l'internalisation des complexes dans ces endosomes précoces. Nous constatons également la présence de vésicules vides comme dans les cellules non transfectées (figure III.16). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Delphine François au cours de son mémoire : elle avait en effet clairement montré la colocalisation de complexes MIWA A35/ADN dans des structures marquées avec des anticorps anti-EEA1 entre 30 et 90 min après le dépôt des complexes. Un exemple est repris à titre de comparaison à la figure III.16 (E).

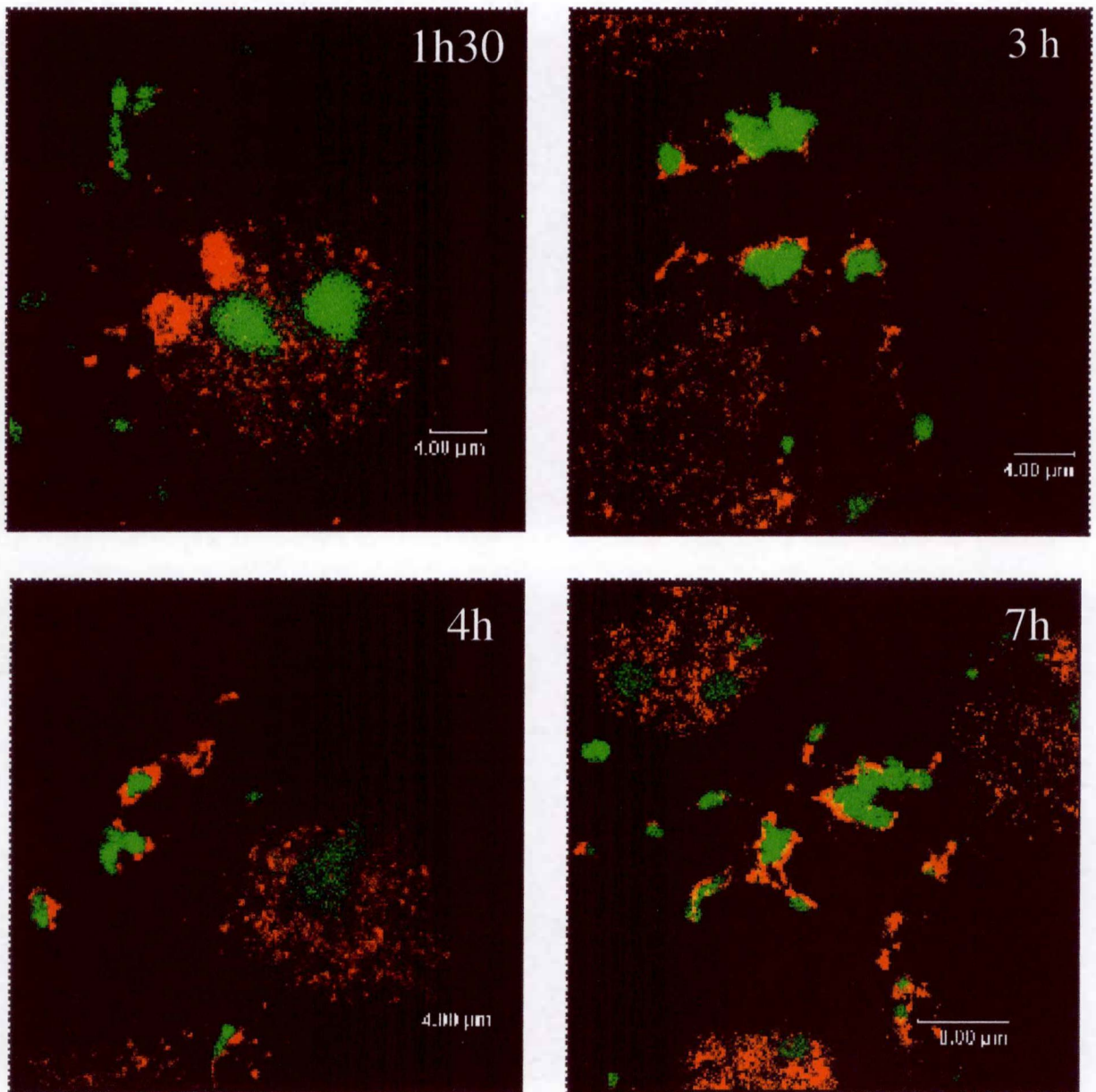
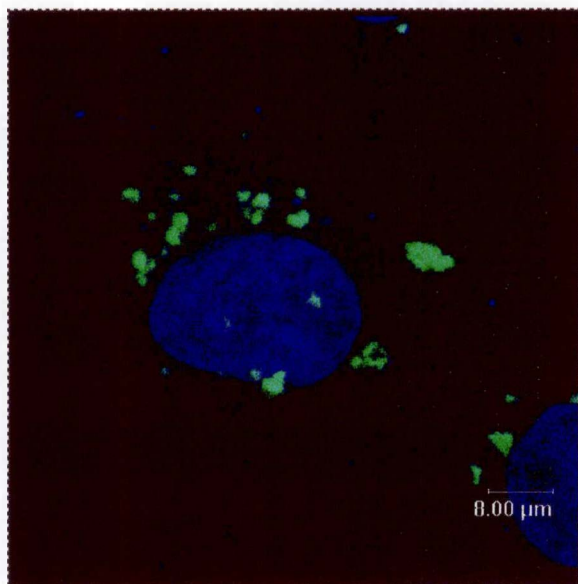
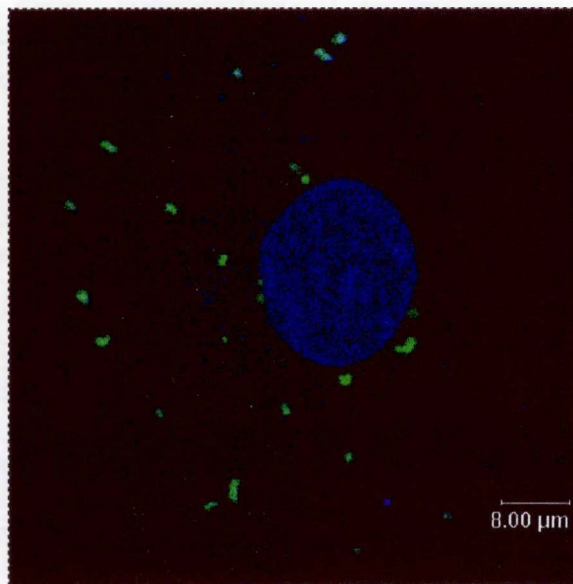


Figure III.17 Micrographies de cellules Cos-7 transfectées avec les complexes ternaires MIWA A61[SEMO B64/pCMVB-YOYO] après marquage des protéines Rab7 et analyse au microscope confocal. En vert, l'ADNp des complexes. En rouge, les endosomes tardifs. Ces images sont prises à différents temps après l'ajout des complexes aux cellules.

MIWA A35/ADN



SF/ADN



MIWA A61[SEMOB64/ADN]

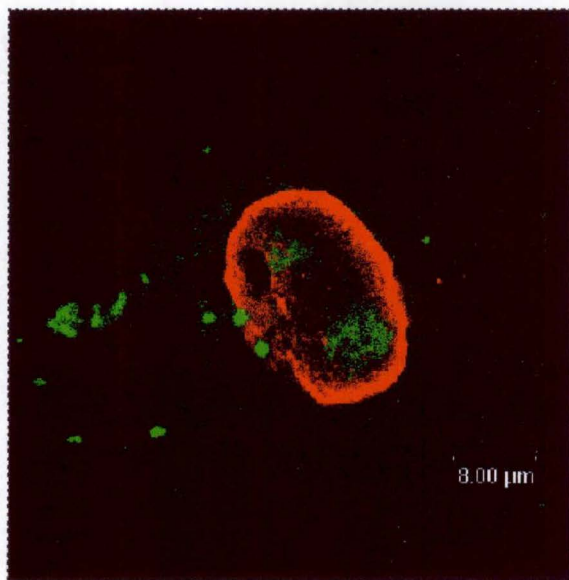


Figure III.18 Micrographies de cellules Cos-7 transfectées avec des complexes MIWA A35/pCMVβ et SF/pCMVβ (issu du mémoire de Delphine François), et avec les complexes ternaires MIWA A61[SEMO B64/pCMVβ]. En vert, l'ADNp des complexes. En bleu, l'ADN endogène marqué au TOPRO. En rouge, la lamine B du noyau

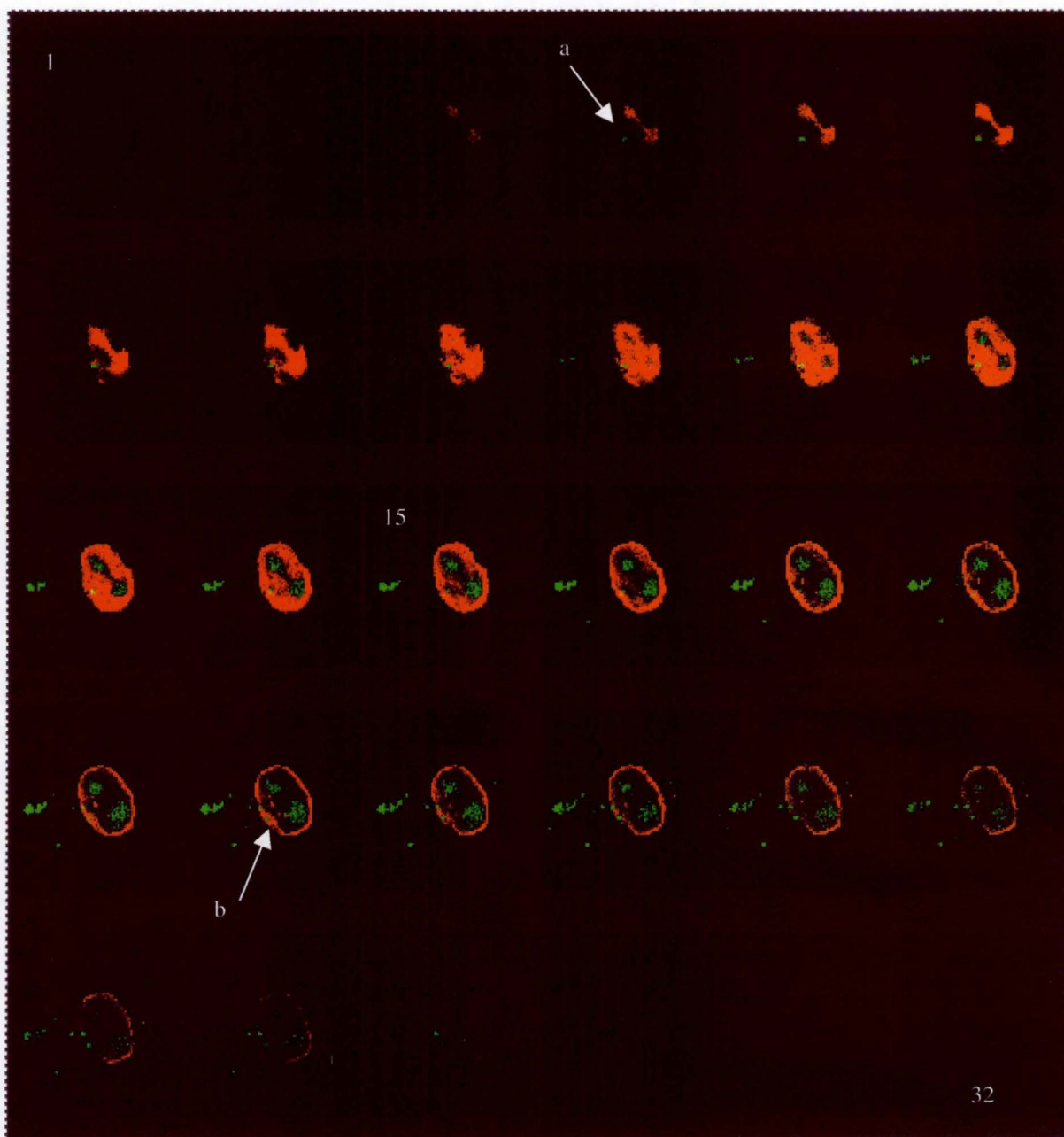
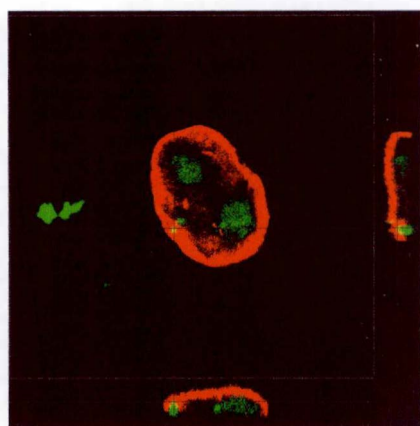


Figure III.19. Galerie obtenue en microscopie confocale de cellules Cos-7, transfectées avec les complexes MIWA A61[SEMO B64/pCMVB], reprenant les 32 coupes optiques prises dans le plan XY. L'image 1 représente le sommet de la cellule et l'image 32, la base. En vert, l'ADNp des complexes. En rouge, le noyau.



y

y

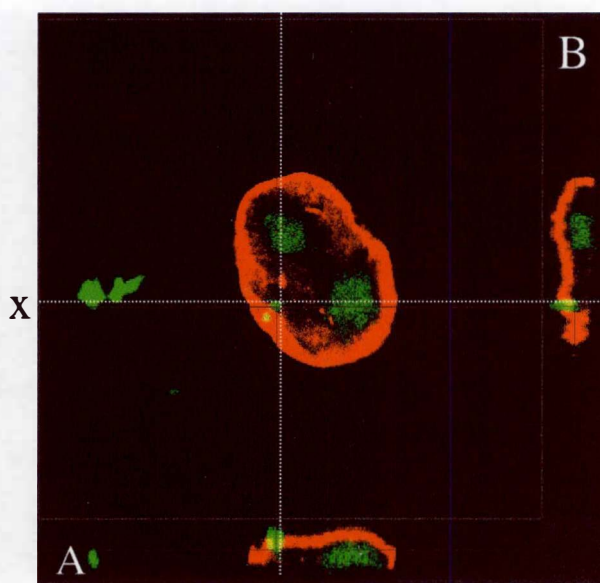
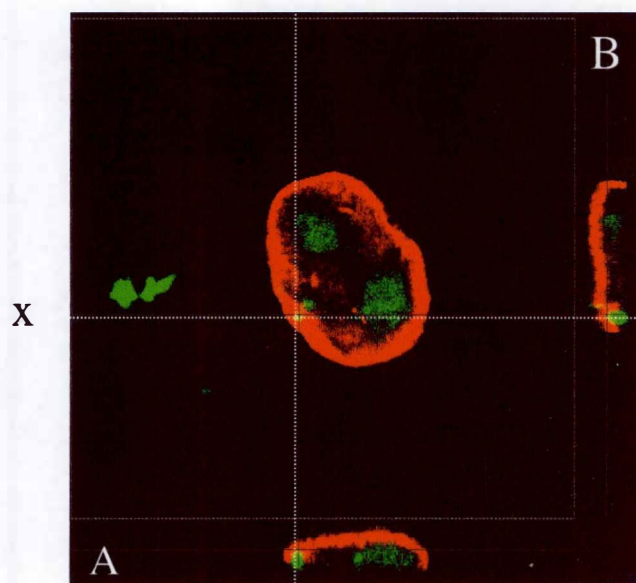


Figure III.20 Analyse dans le plan Z de cellules Cos-7 transfectées avec les complexes MIWA A61[SEMO B64/pCMVβ] au microscope confocal après 5 h de transfection. Pour les détails, voir texte. En vert, l'ADNp des complexes. En rouge, la lamine B nucléaire.

Les conditions de perméabilisation des cellules et de marquage des protéines EEA1 ont changé depuis les expériences de Delphine François :

- perméabilisation plus douce : 0.2 % pendant 10 min au lieu de 1 % durant 5 min,
- anticorps monoclonaux de souris au lieu d'anticorps de chèvre.

Nous avons donc repris les anciennes conditions décrites par Delphine François, mais nous ne retrouvons pas les images de colocalisation complexes/endosomes précoces précédemment observées. Une autre différence est le type de polymère utilisé : le MIWA A35 précédemment utilisé est un copolymère avec amorce de PEO avec un Mn de 30 800 (nous ne l'avons pas retesté). Ces différences de composition et de taille sont des facteurs importants pour l'efficacité de transfection et semblent influencer le cheminement intracellulaire.

En ce qui concerne le marquage des endosomes tardifs, nous détectons clairement des complexes associés à des structures reconnues par les anticorps anti-Rab7 (figure III.17). Ces colocalisations sont visibles entre 3 et 7 h après le dépôt des complexes sur les cellules. A nouveau, les complexes ne sont pas localisés dans les vésicules mais semblent plutôt accompagnés par celles-ci. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour les complexes MIWA A25/ADN par Delphine François.

A 7 h, nous pouvons remarquer l'agrégation sous forme très irrégulière des complexes. Elle est nettement plus importante que pour des complexes MIWA A35/ADN ou SF/ADN (figure III.18). Les images pour le MIWA A35 et le SF ont été obtenues avec un marquage au TOPRO, un agent intercalant qui lie l'ADN endogène et émet dans le bleu. Dans nos expériences, nous avons localisé le noyau à l'aide des anticorps de chèvre anti-lamine B, révélés avec des anticorps secondaires de singe anti-IgG de chèvre couplé à un fluorochrome Alexa Fluor 568.

Nous observons que les complexes formés à partir du SF sont plus petits que ceux formés avec les polymères de méthacrylate, qui diffèrent également en taille selon leur structure.

III.2.2.4 Transfection des cellules Cos-7 avec les complexes ternaires MIWA A61 [SEMO B64/pCMVB] et marquage du noyau

Le marquage de la lamine nucléaire permet de délimiter clairement le noyau et d'observer les replis de la membrane nucléaire. A première vue certains complexes apparaissent dans le noyau. L'avantage de l'analyse en microscopie confocale est de pouvoir déterminer de façon non ambiguë si les complexes détectés sont réellement présents dans le noyau. En effet, une visualisation uniquement dans un plan XY de la cellule ne suffit pas, il se peut que les complexes observés dans les replis de la membrane (figure III.18) se trouvent juste au-dessus ou au-dessous du noyau ou encore accolés à la membrane, mais pas entièrement dans le noyau.

Pour résoudre ce problème, différentes méthodes informatiques de traitements d'images peuvent être utilisées en microscopie confocale.

Une possibilité est de faire une série de coupes optiques de 0.2 μm dans l'épaisseur de la cellule pour former une galerie où chaque image représente un plan focal différent. En parcourant les différentes images (figure III.19), nous détectons assez facilement le complexe qui se trouve en fait au-dessus du noyau (a) ou celui qui est dans l'épaisseur de la membrane nucléaire (b).

Pour confirmer ces résultats, nous pouvons également travailler dans le plan Z. La planche 15 de la galerie a été analysée de cette manière (figure III.20). Si nous regardons dans le plan Z, la section de la cellule au niveau de la ligne X, nous obtenons l'image A. De même l'image B est obtenue à partir de la ligne Y (dans le plan Z). Cela permet de déterminer de façon non ambiguë que les complexes sont accolés à la membrane ou dans le noyau. A la figure III.20, les complexes sont enrobés dans la lamine et semblent entrer dans le noyau.

III.2.2.5 Discussion

Dans le cadre de cette deuxième approche, nous avons utilisé la technique de l'immunocytochimie couplée à la révélation en fluorescence au microscope confocal, pour cibler différents compartiments impliqués dans l'endocytose :

- l'endosome précoce via la protéine spécifique EEA1,
- l'endosome tardif via la protéine spécifique Rab7,
- le noyau via la protéine spécifique lamine B.

Les complexes de transfection ont été formés à partir :

- de l'ADNp marqué au YOYO-1 pour permettre leur visualisation intracellulaire,
- du mélange de polymères SEMO B64/MIWA A61 qui s'est avéré prometteur pour transfecter les cellules Cos-7 en présence de sérum.

Nous avons vérifié par la méthode du double marquage (EEA1/Rab7) que nous marquons bien des endosomes distincts. Ils présentent un aspect et une localisation particulière. En effet, EEA1 (endosome précoce) est situé près du noyau, alors que Rab7 (endosome tardif) se trouve plus dispersé dans la cellule. Cette localisation périnucléaire des endosomes précoces est étonnante étant donné son rôle précoce dans l'endocytose après l'internalisation des complexes.

Nous n'observons pas clairement de complexes dans des vésicules endosomales, mais très régulièrement accolées à ces vésicules. La taille des complexes est souvent plus grande que le diamètre des vésicules. Les complexes semblent plutôt être accompagnés lors de leur transport vers le noyau. Selon la cinétique d'internalisation réalisée, ce phénomène apparaît dès les temps courts (1-2 h) dans le cas des endosomes précoces et après 3 h pour les endosomes tardifs. Ce phénomène d'accompagnement est plus marqué dans le cas de Rab7 et s'observe même après 7 h.

Dans le mémoire 2001-2002 de Delphine François, la colocalisation entre complexes et endosomes précoces était plus claire. Dans ce cas, les complexes utilisés étaient composés uniquement de copolymères MIWA A35 avec amorce de PEO et ils étaient plus petits que les complexes que nous avons utilisés, qui eux, sont composés d'un mélange de polymères et copolymères à bloc. Ces paramètres taille/composition semblent donc influencer le cheminement et leur passage via des vésicules « endosome-like » ou non.

Le fait que les complexes s'agrègent est souvent un signe que la proportion relative en PEO est trop faible.

La microscopie confocale est un outil très puissant dont l'intérêt est de pouvoir éliminer le bruit de fond provenant des autres plans pour n'obtenir qu'une image nette prise dans un seul plan à la fois; principalement le fait de pouvoir faire plusieurs coupes optiques dans la profondeur de la cellule permet d'affirmer de manière certaine que les complexes sont bien localisés dans le compartiment donné et non dans les plans au-dessus ou en-dessous. C'est pourquoi nous avons utilisé ce mode d'analyse pour déterminer si les complexes étaient oui ou non dans le noyau cellulaire. Selon différentes coupes réalisées sur le même noyau, nous observons bien toute l'ambiguïté qui peut subsister si l'on ne montrait qu'une seule image ou les complexes apparaissent dans le noyau, alors que l'analyse dans le plan Z rend la réalité toute autre. En effet, nous avons observé des complexes dans l'épaisseur du réseau de lamine, mais pas nettement dans le noyau. Ce réseau pourrait représenter une barrière supplémentaire à franchir pour les complexes.

Il faut cependant noter que dans cette analyse très préliminaire, les complexes ont été détectés après 5 h de transfection. Nous devons évidemment refaire cette expérience avec des temps de transfection plus longs, puisque les figures 17 et 18 montrent que jusque 7 h, beaucoup de complexes sont encore associés avec des structures de type endosomales.

On ne peut exclure qu'on ne voit que les complexes qui s'agrègent. Des petits complexes pourraient être véhiculés par les endosomes et passer le noyau mais ils ne seraient pas suffisamment marqués pour être détectés.

Notre travail s'intègre dans la mise au point d'un vecteur synthétique à base de polymères de méthacrylate pour la transfection de cellules.

Une stratégie innovatrice développée au laboratoire de biologie cellulaire (URBC) est basée sur la formation de complexes à partir de 2 types de polymères :

- un homopolymère de MADAM (méthacrylate de (2-diméthylamino)éthyl) capable de condenser l'ADN et de transfecter efficacement les cellules Cos-7 *in vitro*, uniquement en absence de sérum.
- un copolymère à bloc contenant des motifs MADAM et des motifs MAPEO qui protègent les complexes des interactions non spécifiques avec les composants du sérum.

La formation des complexes est réalisée en 2 temps : le P(MADAM) est mis en présence de l'ADN et le co-polymère est ajouté aux complexes P(MADAM)/ADN préformés. De ce fait, les chaînes de PEO sont exposées en surface des complexes, permettant de réduire les interactions indésirables, et d'assurer la transfection des cellules Cos-7 en présence de sérum.

Durant ce mémoire, nous avons entamé une étude préliminaire des étapes précoces de l'internalisation des complexes ternaires formés à partir du P(MADAM) SEMO B64 et du copolymère MIWA A61. Les mécanismes cellulaires impliqués dans la transfection sont peu connus. Ce travail ne vise pas à les détailler mais à essayer d'identifier si une étape est limitante pour obtenir une transfection efficace. Cela afin de proposer de nouvelles structures pour les polymères ou les complexes, pour améliorer la transfection. Pour cela, deux approches ont été utilisées.

D'une part, nous avons agi à divers niveaux du processus d'endocytose, généralement décrit comme mode d'internalisation des polymères cationiques, en utilisant des agents chimiques :

- la cytochalasine B pour inhiber la polymérisation du cytosquelette d'actine,
- le LY 294002 pour inhiber l'activité de la PI3K,
- la bafilomycine A1 pour inhiber les pompes à protons vacuolaires,
- la chloroquine pour tamponner le pH vésicules acides..

Nous avons obtenu des résultats surprenants avec la cytochalasine B et le LY294002.

En absence de sérum, ces deux agents semblent, de manière inattendue, améliorer l'efficacité de transfection des polymères de méthacrylate. Pour les complexes ternaires testés en présence de sérum, on observe dans ces conditions, une inhibition de la transfection. Nous n'avons pas d'explications à fournir à ce stade de l'étude, mais il est cependant intéressant de constater que ces agents permettent d'améliorer l'efficacité de transfection des polymères de méthacrylate lorsqu'on travaille en absence de sérum.

Le LY294002 a été choisi pour sa grande spécificité et sa solubilité, cependant cet inhibiteur de la PI3K est réversible, c'est pourquoi son effet positif sur la transfection ne s'observe qu'en traitement prolongé. Il serait donc judicieux de tester également la wortmannine (un inhibiteur irréversible de la PI3K) et de vérifier son effet sur l'efficacité de transfection en absence et en présence de sérum pour éclairer les résultats que nous avons obtenus.

D'autres agents peuvent être également envisagés et testés en transfection, comme la phalloïdine qui contrairement à la cytochalasine stabilise le cytosquelette d'actine, pour voir si dans ce cas, on observe un effet opposé ou encore le nocodazole qui modifie également le cytosquelette, mais en dépolymérisant les microtubules. En marquant l'actine, on pourrait également observer son remodelage en présence de ces agents et l'effet éventuel de ce remodelage sur l'internalisation des complexes.

Nous avons également utilisé des agents qui interfèrent avec l'acidification des endosomes : la bafilomycine et la chloroquine. Très clairement, nos résultats montrent que cette acidification est cruciale pour la sortie des complexes des vésicules, que ce soit avec le SF ou les polymères de méthacrylate. En effet, le traitement à la bafilomycine réduit l'efficacité de transfection pour les 3 types de polycations testés. La cinétique de sortie des endosomes est cependant différente selon les polymères : le SF permet une sortie très rapide étant donné que la bafilomycine ajoutée après 4 h n'a plus d'effet sur l'efficacité de transfection ; par contre pour les polymères de méthacrylate, ce processus est beaucoup plus étalé dans le temps. La sortie des endosomes semble donc représenter une étape limitante pour les polymères.

Par l'utilisation de chloroquine, nous avons voulu voir si il était possible d'améliorer cette étape. Les taux de transfection, et pour le SF et, pour les polymères, sont augmentés du même ordre de grandeur en présence de chloroquine (2-3 fois). Par comparaison, pour les PLL, l'effet de la chloroquine est beaucoup plus marqué. La toxicité de la chloroquine ne permet pas son application *in vivo* au doses requises, mais elle peut être éventuellement remplacée par des peptides fusiogènes. L'amélioration très faible du taux de transfection avec les polymères en présence de chloroquine suggère que les polymères de méthacrylate sont capables de déstabiliser la membrane endosomale. La stratégie visant à greffer des peptides fusiogènes sur le polycation introduit des étapes de synthèse et de contrôle de qualité supplémentaires et augmente donc les contraintes de production. Ce n'est peut-être pas une stratégie à suivre en priorité.

Par contre, l'augmentation du nombre de fonctions amines protonables du polymère pourrait constituer une alternative plus facile à mettre en œuvre pour améliorer l'activité endosomolytique des polymères. Cela suppose donc la synthèse de polymères plus longs. Des P(MADAM) de très grandes tailles ($M_n = 100\ 000$) sont en cours de synthèse, et pour être compatibles avec la filtration rénale, des liaisons esters sont introduites dans le polymère afin de le rendre biodégradable.

La seconde partie du travail a consisté à suivre les complexes ternaires au sein des cellules Cos-7 à l'aide de l'immunocytochimie combinée à la microscopie confocale, afin d'observer si les complexes passent par une voie d'endocytose classique. Nous n'avons pas observé de complexes associés à des structures de type endosomes précoces, ce que nous n'expliquons pas. Par contre un phénomène d'accompagnement par des structures contenant le marqueur Rab7, spécifique des endosomes tardifs, est observé jusqu'à des temps longs (7 h post-transfection). Ceci est en accord avec les résultats d'activité β -gal obtenus en présence de bafilomycine, qui ont montré que la sortie des complexes des endosomes est un phénomène étalé dans le temps pour les polymères de méthacrylate.

Dans ce travail, nous n'avons fait que dégrossir le problème de l'internalisation et du cheminement intracellulaire des complexes polymères/ADN. Nous aurions souhaité prospecter d'autres voies d'entrée telles que l'endocytose dépendante des cavéoles. Les tests préliminaires de marquage des cavéoles avec des anticorps spécifiques ont été réalisés. Nous n'avons pas pu investiguer cette voie plus à fond, par manque de temps.

Jusqu'à présent, la partie du complexe qui est marquée est l'ADNp préincubé en présence de YOYO-1. Nous ne suivons donc pas réellement les complexes, mais l'ADNp qu'ils contiennent. L'utilisation d'un polymère marqué par un fluorochrome (par exemple, la lissamine rhodamine), ou encore le double marquage de l'ADN et du polymère, permettrait d'étudier l'étape de dissociation des complexes, qui reste encore énigmatique. La synthèse d'un polymère marqué à la lissamine rhodamine est en cours au service SMPC de Mons.

Enfin, pour évaluer l'internalisation des complexes, nous disposons soit de méthodes immunocytochimiques qui se prêtent mal à des screenings, soit de tests colorimétriques de l'activité β -galactosidase. Mais dans ce cas, nous mesurons le résultat final, 24 heures après la transfection. Il manque dans ce travail, une méthode qui puisse suivre et quantifier facilement la toute première étape d'internalisation. Le laboratoire vient d'acquérir le système Bioanalyser de la firme Agilent, avec l'option pour la biologie cellulaire. Cette dernière permettra de déterminer facilement le nombre de cellules ayant internalisé des complexes fluorescents, par une micro-analyse en cytométrie de flux. Cette approche, en parallèle avec la microscopie confocale et la colorimétrie, devrait nous aider à mieux comprendre le mécanisme cellulaire à la base de la transfection avec les polymères utilisés, mais aussi de continuer à améliorer les polymères avec la collaboration de l'équipe de Mons qui les synthétise.

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre travail s'intègre dans la mise au point d'un vecteur synthétique à base de polymères de méthacrylate pour la transfection de cellules.

Une stratégie innovatrice développée au laboratoire de biologie cellulaire (URBC) est basée sur la formation de complexes à partir de 2 types de polymères :

- un homopolymère de MADAM (méthacrylate de (2-diméthylamino)éthyl) capable de condenser l'ADN et de transfecter efficacement les cellules Cos-7 *in vitro*, uniquement en absence de sérum.
- un copolymère à bloc contenant des motifs MADAM et des motifs MAPEO qui protègent les complexes des interactions non spécifiques avec les composants du sérum.

La formation des complexes est réalisée en 2 temps : le P(MADAM) est mis en présence de l'ADN et le co-polymère est ajouté aux complexes P(MADAM)/ADN préformés. De ce fait, les chaînes de PEO sont exposées en surface des complexes, permettant de réduire les interactions indésirables, et d'assurer la transfection des cellules Cos-7 en présence de sérum.

Durant ce mémoire, nous avons entamé une étude préliminaire des étapes précoces de l'internalisation des complexes ternaires formés à partir du P(MADAM) SEMO B64 et du copolymère MIWA A61. Les mécanismes cellulaires impliqués dans la transfection sont peu connus. Ce travail ne vise pas à les détailler mais à essayer d'identifier si une étape est limitante pour obtenir une transfection efficace. Cela afin de proposer de nouvelles structures pour les polymères ou les complexes, pour améliorer la transfection. Pour cela, deux approches ont été utilisées.

D'une part, nous avons agi à divers niveaux du processus d'endocytose, généralement décrit comme mode d'internalisation des polymères cationiques, en utilisant des agents chimiques :

- la cytochalasine B pour inhiber la polymérisation du cytosquelette d'actine,
- le LY 294002 pour inhiber l'activité de la PI3K,
- la bafilomycine A1 pour inhiber les pompes à protons vacuolaires,
- la chloroquine pour tamponner le pH vésicules acides..

Nous avons obtenu des résultats surprenants avec la cytochalasine B et le LY294002.

En absence de sérum, ces deux agents semblent, de manière inattendue, améliorer l'efficacité de transfection des polymères de méthacrylate. Pour les complexes ternaires testés en présence de sérum, on observe dans ces conditions, une inhibition de la transfection. Nous n'avons pas d'explications à fournir à ce stade de l'étude, mais il est cependant intéressant de constater que ces agents permettent d'améliorer l'efficacité de transfection des polymères de méthacrylate lorsqu'on travaille en absence de sérum.

Le LY294002 a été choisi pour sa grande spécificité et sa solubilité, cependant cet inhibiteur de la PI3K est réversible, c'est pourquoi son effet positif sur la transfection ne s'observe qu'en traitement prolongé. Il serait donc judicieux de tester également la wortmannine (un inhibiteur irréversible de la PI3K) et de vérifier son effet sur l'efficacité de transfection en absence et en présence de sérum pour éclairer les résultats que nous avons obtenus.

D'autres agents peuvent être également envisagés et testés en transfection, comme la phalloïdine qui contrairement à la cytochalasine stabilise le cytosquelette d'actine, pour voir si dans ce cas, on observe un effet opposé ou encore le nocodazole qui modifie également le cytosquelette, mais en dépolymérisant les microtubules. En marquant l'actine, on pourrait également observer son remodelage en présence de ces agents et l'effet éventuel de ce remodelage sur l'internalisation des complexes.

Nous avons également utilisé des agents qui interfèrent avec l'acidification des endosomes : la bafilomycine et la chloroquine. Très clairement, nos résultats montrent que cette acidification est cruciale pour la sortie des complexes des vésicules, que ce soit avec le SF ou les polymères de méthacrylate. En effet, le traitement à la bafilomycine réduit l'efficacité de transfection pour les 3 types de polycations testés. La cinétique de sortie des endosomes est cependant différente selon les polymères : le SF permet une sortie très rapide étant donné que la bafilomycine ajoutée après 4 h n'a plus d'effet sur l'efficacité de transfection ; par contre pour les polymères de méthacrylate, ce processus est beaucoup plus étalé dans le temps. La sortie des endosomes semble donc représenter une étape limitante pour les polymères.

Par l'utilisation de chloroquine, nous avons voulu voir si il était possible d'améliorer cette étape. Les taux de transfection, et pour le SF et, pour les polymères, sont augmentés du même ordre de grandeur en présence de chloroquine (2-3 fois). Par comparaison, pour les PLL, l'effet de la chloroquine est beaucoup plus marqué. La toxicité de la chloroquine ne permet pas son application *in vivo* au doses requises, mais elle peut être éventuellement remplacée par des peptides fusiogènes. L'amélioration très faible du taux de transfection avec les polymères en présence de chloroquine suggère que les polymères de méthacrylate sont capables de déstabiliser la membrane endosomale. La stratégie visant à greffer des peptides fusiogènes sur le polycation introduit des étapes de synthèse et de contrôle de qualité supplémentaires et augmente donc les contraintes de production. Ce n'est peut-être pas une stratégie à suivre en priorité.

Par contre, l'augmentation du nombre de fonctions amines protonables du polymère pourrait constituer une alternative plus facile à mettre en œuvre pour améliorer l'activité endosomolytique des polymères. Cela suppose donc la synthèse de polymères plus longs. Des P(MADAM) de très grandes tailles ($M_n = 100\,000$) sont en cours de synthèse, et pour être compatibles avec la filtration rénale, des liaisons esters sont introduites dans le polymère afin de le rendre biodégradable.

La seconde partie du travail a consisté à suivre les complexes ternaires au sein des cellules Cos-7 à l'aide de l'immunocytochimie combinée à la microscopie confocale, afin d'observer si les complexes passent par une voie d'endocytose classique. Nous n'avons pas observé de complexes associés à des structures de type endosomes précoces, ce que nous n'expliquons pas. Par contre un phénomène d'accompagnement par des structures contenant le marqueur Rab7, spécifique des endosomes tardifs, est observé jusqu'à des temps longs (7 h post-transfection). Ceci est en accord avec les résultats d'activité β -gal obtenus en présence de bafilomycine, qui ont montré que la sortie des complexes des endosomes est un phénomène étalé dans le temps pour les polymères de méthacrylate.

Dans ce travail, nous n'avons fait que dégrossir le problème de l'internalisation et du cheminement intracellulaire des complexes polymères/ADN. Nous aurions souhaité prospecter d'autres voies d'entrée telles que l'endocytose dépendante des cavéoles. Les tests préliminaires de marquage des cavéoles avec des anticorps spécifiques ont été réalisés. Nous n'avons pas pu investiguer cette voie plus à fond, par manque de temps.

Jusqu'à présent, la partie du complexe qui est marquée est l'ADNp préincubé en présence de YOYO-1. Nous ne suivons donc pas réellement les complexes, mais l'ADNp qu'ils contiennent. L'utilisation d'un polymère marqué par un fluorochrome (par exemple, la lissamine rhodamine), ou encore le double marquage de l'ADN et du polymère, permettrait d'étudier l'étape de dissociation des complexes, qui reste encore énigmatique. La synthèse d'un polymère marqué à la lissamine rhodamine est en cours au service SMPC de Mons.

Enfin, pour évaluer l'internalisation des complexes, nous disposons soit de méthodes immunocytochimiques qui se prêtent mal à des screenings, soit de tests colorimétriques de l'activité β -galactosidase. Mais dans ce cas, nous mesurons le résultat final, 24 heures après la transfection. Il manque dans ce travail, une méthode qui puisse suivre et quantifier facilement la toute première étape d'internalisation. Le laboratoire vient d'acquérir le système Bioanalyser de la firme Agilent, avec l'option pour la biologie cellulaire. Cette dernière permettra de déterminer facilement le nombre de cellules ayant internalisé des complexes fluorescents, par une micro-analyse en cytométrie de flux. Cette approche, en parallèle avec la microscopie confocale et la colorimétrie, devrait nous aider à mieux comprendre le mécanisme cellulaire à la base de la transfection avec les polymères utilisés, mais aussi de continuer à améliorer les polymères avec la collaboration de l'équipe de Mons qui les synthétise.

V. BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Aderem, A. and Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, **17**, 593-623.
- Alberts, B. (2002) *Molecular Biology of the cell*. Garland Science.
- Alexakis, T., Boadi, D.K., Quong, D., Groboillot, A., O'Neill, I., Poncelet, D. and Neufeld, R.J. (1995) Microencapsulation of DNA within alginate microspheres and crosslinked chitosan membranes for in vivo application. *Appl Biochem Biotechnol*, **50**, 93-106.
- Amabile, P.G., Waugh, J.M., Lewis, T.N., Elkins, C.J., Janas, W. and Dake, M.D. (2001) High-efficiency endovascular gene delivery via therapeutic ultrasound. *J Am Coll Cardiol*, **37**, 1975-1980.
- Anderson, R.G. (1993a) Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci US A*, **90**, 10909-10913.
- Anderson, R.G. (1993b) Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 647-652.
- Anderson, R.G., Kamen, B.A., Rothberg, K.G. and Lacey, S.W. (1992) Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science*, **255**, 410-411.
- Anderson, W.F. (1998) Human gene therapy. *Nature*, **392**, 25-30.
- Araki, N., Johnson, M.T. and Swanson, J.A. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol*, **135**, 1249-1260.
- Ayscough, K.R. (2000) Endocytosis and the development of cell polarity in yeast require a dynamic F-actin cytoskeleton. *Curr Biol*, **10**, 1587-1590.
- Bar-Sagi, D. and Feramisco, J.R. (1986) Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science*, **233**, 1061-1068.
- Belting, M. and Petersson, P. (1999) Protective role for proteoglycans against cationic lipid cytotoxicity allowing optimal transfection efficiency in vitro. *Biochem J*, **342**, 281-286.
- Bieber, T., Meissner, W., Kostin, S., Niemann, A. and Elsasser, H.P. (2002) Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J Control Release*, **82**, 441-454.
- Bielinska, A.U., Kukowska-Latallo, J.F. and Baker, J.R., Jr. (1997) The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA. *Biochim Biophys Acta*, **1353**, 180-190.
- Blessing, T., Kurs, M., Holzhauser, R., Kircheis, R. and Wagner, E. (2001) Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. *Bioconjug Chem*, **12**, 529-537.
- Bogerd, H.P., Benson, R.E., Truant, R., Herold, A., Phingbodhipakkiya, M. and Cullen, B.R. (1999) Definition of a consensus transportin-specific nucleocytoplasmic transport signal. *J Biol Chem*, **274**, 9771-9777.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J.P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci US A*, **92**, 7297-7301.
- Brodsky, F.M., Chen, C.Y., Knuehl, C., Towler, M.C. and Wakeham, D.E. (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 517-568.
- Brown, M.D., Schatzlein, A.G. and Uchegbu, I.F. (2001) Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm*, **229**, 1-21.
- Brunner, S., Furtbauer, E., Sauer, T., Kurs, M. and Wagner, E. (2002) Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol Ther*, **5**, 80-86.
- Brunner, S., Sauer, T., Carotta, S., Cotten, M., Saltik, M. and Wagner, E. (2000) Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther*, **7**, 401-407.
- Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B. and Zerial, M. (1992) The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, **70**, 715-728.
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. and van Deurs, B. (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell*, **11**, 467-480.
- Byk, G., Dubertret, C., Escriou, V., Frederic, M., Jaslin, G., Rangara, R., Pitard, B., Crouzet, J., Wils, P., Schwartz, B. and Scherman, D. (1998) Synthesis, activity, and structure-activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer. *J Med Chem*, **41**, 229-235.
- Callaghan, J., Nixon, S., Bucci, C., Toh, B.H. and Stenmark, H. (1999) Direct interaction of EEA1 with Rab5b. *Eur J Biochem*, **265**, 361-366.
- Capecchi, M.R. (1980) High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, **22**, 479-488.
- Caron, E. and Hall, A. (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*, **282**, 1717-1721.
- Cavazzana-Calvo, M., Hache-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bouso, P., Deist, F.L. and Fischer, A. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, **288**, 669-672.
- Chandy, T. and Sharma, C.P. (1990) Chitosan--as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs*, **18**, 1-24.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, **7**, 2745-2752.
- Chen, Q.R., Zhang, L., Stass, S.A. and Mixson, A.J. (2001) Branched co-polymers of histidine and lysine are efficient carriers of plasmids. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1334-1340.
- Cheng, J.Y., van de Wetering, P., Talsma, H., Crommelin, D.J. and Hennink, W.E. (1996) Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharm Res*, **13**, 1038-1042.
- Chirila, T.V. (2001) An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application. *Biomaterials*, **22**, 3311-3317.
- Choi, Y.H., Liu, F., Kim, J.S., Choi, Y.K., Park, J.S. and Kim, S.W. (1998) Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier. *J Control Release*, **54**, 39-48.
- Conner, S.D. and Schmid, S.L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, **422**, 37-44.
- Cristiano, R.J. and Roth, J.A. (1996) Epidermal growth factor mediated DNA delivery into lung cancer cells via the epidermal growth factor receptor. *Cancer Gene Ther*, **3**, 4-10.
- D'Arrigo, A., Bucci, C., Toh, B.H. and Stenmark, H. (1997) Microtubules are involved in bafilomycin A1-induced tubulation and Rab5-dependent vacuolation of early endosomes. *Eur J Cell Biol*, **72**, 95-103.
- Damke, H., Baba, T., van der Bliek, A.M. and Schmid, S.L. (1995) Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol*, **131**, 69-80.
- Dash, P.R., Read, M.L., Fisher, K.D., Howard, K.A., Wolfert, M., Oupicky, D., Subr, V., Strohalm, J., Ulbrich, K. and Seymour, L.W. (2000) Decreased binding to proteins and cells of polymeric gene delivery vectors surface modified with a multivalent hydrophilic polymer and retargeting through attachment of transferrin. *J Biol Chem*, **275**, 3793-3802.
- Delepine, P., Guillaume, C., Floch, V., Loisel, S., Yaouanc, J., Clement, J., Des Abbayes, H. and Ferec, C. (2000) Cationic phosphonolipids as nonviral vectors: in vitro and in vivo applications. *J Pharm Sci*, **89**, 629-638.

Bibliographie

- Delgado, C., Francis, G.E. and Fisher, D. (1992) The uses and properties of PEG-linked proteins. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, **9**, 249-304.
- Demeneix, B., Behr, J., Boussif, O., Zanta, M.A., Abdallah, B. and Remy, J. (1998) Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev*, **30**, 85-95.
- DePina, A.S. and Langford, G.M. (1999) Vesicle transport: the role of actin filaments and myosin motors. *Microsc Res Tech*, **47**, 93-106.
- Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G. and Griffiths, G. (1994) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol*, **124**, 677-688.
- Doxsey, S.J., Brodsky, F.M., Blank, G.S. and Helenius, A. (1987) Inhibition of endocytosis by anti-clathrin antibodies. *Cell*, **50**, 453-463.
- Dupree, P., Parton, R.G., Raposo, G., Kurzchalia, T.V. and Simons, K. (1993) Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *Embo J*, **12**, 1597-1605.
- Ellis, S. and Mellor, H. (2000) Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends Cell Biol*, **10**, 85-88.
- Emi, N. and Kidoaki, S. (1997) Gene transfer mediated by polyarginine requires a formation of big carrier-complex of DNA aggregate. *Biochim Biophys Acta*, **231**(2), 421-424.
- Erbacher, P., Roche, A.C., Monsigny, M. and Midoux, P. (1996) Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Exp Cell Res*, **225**, 186-194.
- Escriou, V., Carriere, M., Scherman, D. and Wils, P. (2003) NLS bioconjugates for targeting therapeutic genes to the nucleus. *Adv Drug Deliv Rev*, **55**, 295-306.
- Escriou, V., Ciolina, C., Lacroix, F., Byk, G., Scherman, D. and Wils, P. (1998) Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta*, **19**, 276-288.
- Esfand, R. and Tomalia, D.A. (2001) Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today*, **6**, 427-436.
- Farhood, H., Serbina, N. and Huang, L. (1995) The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta*, **4**, 289-295.
- Felgner, P.L., Barenholz, Y., Behr, J.P., Cheng, S.H., Cullis, P., Huang, L., Jessee, J.A., Seymour, L., Szoka, F., Thierry, A.R., Wagner, E. and Wu, G. (1997) Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther*, **8**, 511-512.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci US A*, **84**, 7413-7417.
- Ferkol, T., Pellicena-Palle, A., Eckman, E., Perales, J.C., Trzaska, T., Tosi, M., Redline, R. and Davis, P.B. (1996) Immunologic responses to gene transfer into mice via the polymeric immunoglobulin receptor. *Gene Ther*, **3**, 669-678.
- Fishman, P.H. (1982) Internalization and degradation of cholera toxin by cultured cells: relationship to toxin action. *J Cell Biol*, **93**, 860-865.
- Forrest, M.L. and Pack, D.W. (2002) On the kinetics of polyplex endocytic trafficking: implications for gene delivery vector design. *Mol Ther*, **6**, 57-66.
- Fujimoto, L.M., Roth, R., Heuser, J.E. and Schmid, S.L. (2000) Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic*, **1**, 161-171.
- Gaullier, J.M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H. and Aasland, R. (1998) FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature*, **394**, 432-433.
- Gavin, R.H. (1997) Microtubule-microfilament synergy in the cytoskeleton. *Int Rev Cytol*, **173**, 207-242.
- Gillooly, D.J., Morrow, I.C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N.J., Gaullier, J.M., Parton, R.G. and Stenmark, H. (2000) Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *Embo J*, **19**, 4577-4588.
- Gillooly, D.J., Simonsen, A. and Stenmark, H. (2001) Phosphoinositides and phagocytosis. *J Cell Biol*, **155**, 15-17.
- Godbey, W.T., Wu, K.K. and Mikos, A.G. (1999) Tracking the intracellular path of poly(ethyleneimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci US A*, **96**, 5177-5181.
- Gottschalk, S., Sparrow, J.T., Hauer, J., Mims, M.P., Leland, F.E., Woo, S.L. and Smith, L.C. (1996) A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther*, **3**, 48-57.
- Goula, D., Benoist, C., Mantero, S., Merlo, G., Levi, G. and Demeneix, B.A. (1998a) Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther*, **5**, 1291-1295.
- Goula, D., Remy, J.S., Erbacher, P., Wasowicz, M., Levi, G., Abdallah, B. and Demeneix, B.A. (1998b) Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther*, **5**, 712-717.
- Gruenberg, J. (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 721-730.
- Gu, F. and Gruenberg, J. (1999) Biogenesis of transport intermediates in the endocytic pathway. *FEBS Lett*, **452**, 61-66.
- Hamm-Alvarez, S.F. (1998) Molecular motors and their role in membrane traffic. *Adv Drug Deliv Rev*, **29**, 229-242.
- Hamm-Alvarez, S.F., Kim, P.Y. and Sheetz, M.P. (1993) Regulation of vesicle transport in CV-1 cells and extracts. *J Cell Sci*, **106**, 955-966.
- Hansen, S.H., Sandvig, K. and van Deurs, B. (1993) Molecules internalized by clathrin-independent endocytosis are delivered to endosomes containing transferrin receptors. *J Cell Biol*, **123**, 89-97.
- Havel, R.J. (1998) Receptor and non-receptor mediated uptake of chylomicron remnants by the liver. *Atherosclerosis*, **141**, S1-7.
- Hein, M., Ernst, M., Moller, F. and Regensburger, D. (1998) Gene transfer into rat heart-derived endothelial cells. *Eur J Cardiothorac Surg*, **13**, 460-466.
- Heini, P.F. and Berlemann, U. (2001) Bone substitutes in vertebroplasty. *Eur Spine J*, **10**, S205-213.
- Herweijer, H. and Wolff, J.A. (2003) Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther*, **10**, 453-458.
- Hirano S, S.H., Akiyama Y, Nonaka I. (1998) Biocompatibility of Chitosan by oral and intravenous administration. *Polym Eng Sci*, **69**, 897-901.
- Hjortkjaer, R.K., Bechgaard, E., Gizurason, S., Suzdak, C., McDonald, P. and Greenough, R.J. (1999) Single- and repeated-dose local toxicity in the nasal cavity of rabbits after intranasal administration of different glycols for formulations containing benzodiazepines. *J Pharm Pharmacol*, **51**, 377-383.
- Illum, L., Farraj, N.F. and Davis, S.S. (1994) Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm Res*, **11**, 1186-1189.
- Imamoto, N. (2000) Diversity in nucleocytoplasmic transport pathways. *Cell Struct Funct*, **25**, 207-216.
- Ishiwata, H., Suzuki, N., Ando, S., Kikuchi, H. and Kitagawa, T. (2000) Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes. *J Control Release*, **69**, 139-148.
- Jahraus, A., Egeberg, M., Hinner, B., Habermann, A., Sackman, E., Pralle, A., Faulstich, H., Rybin, V., Defacque, H. and Griffiths, G. (2001) ATP-dependent membrane assembly of F-actin facilitates membrane fusion. *Mol Biol Cell*, **12**, 155-170.
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M. and Aktories, K. (1995) Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature*, **375**, 500-503.
- Kabanov, V.A. and Kabanov, A.V. (1998) Interpolyelectrolyte and block ionomer complexes for gene delivery: physico-chemical aspects. *Adv Drug Deliv Rev*, **30**, 49-60.
- Kichler, A., Leborgne, C., Coeytaux, E. and Danos, O. (2001) Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med*, **3**, 135-144.

Bibliographie

- Kim, J.S., Maruyama, A., Akaike, T. and Kim, S.W. (1998) Terplex DNA delivery system as a gene carrier. *Pharm Res*, **15**, 116-121.
- Kirchis, R., Wightman, L., Schreiber, A., Robitza, B., Rossler, V., Kurs, M. and Wagner, E. (2001a) Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther*, **8**, 28-40.
- Kirchis, R., Wightman, L. and Wagner, E. (2001b) Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev*, **53**, 341-358.
- Kopecek, J., Kopeckova, P., Minko, T. and Lu, Z. (2000) HEMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action. *Eur J Pharm Biopharm*, **50**, 61-81.
- Koping-Hoggard, M., Tubulekas, I., Guan, H., Edwards, K., Nilsson, M., Varum, K.M. and Artursson, P. (2001) Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther*, **8**, 1108-1121.
- Kukowska-Latallo, J.F., Bielinska, A.U., Johnson, J., Spindler, R., Tomalia, D.A. and Baker, J.R., Jr. (1996) Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4897-4902.
- Kurs, M., Walker, G.F., Roessler, V., Ogris, M., Roedel, W., Kirchis, R. and Wagner, E. (2003) Novel Shielded Transferrin-Polyethylene Glycol-Polyethylenimine/DNA Complexes for Systemic Tumor-Targeted Gene Transfer. *Bioconjug Chem*, **14**, 222-231.
- Kurzchalia, T.V., Dupree, P., Parton, R.G., Kellner, R., Virta, H., Lehnert, M. and Simons, K. (1992) VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol*, **118**, 1003-1014.
- Kwiatkowska, K. and Sobota, A. (1999) Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays*, **21**, 422-431.
- Kwoh, D.Y., Coffin, C.C., Lollo, C.P., Jovenal, J., Banaszczuk, M.G., Mullen, P., Phillips, A., Amini, A., Fabrycki, J., Bartholomew, R.M., Brostoff, S.W. and Carlo, D.J. (1999) Stabilization of poly-L-lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver. *Biochim Biophys Acta*, **16**, 171-190.
- Labat-Moleur, F., Steffan, A.M., Brisson, C., Perron, H., Feugeas, O., Furstenberger, P., Oberling, F., Brambilla, E. and Behr, J.P. (1996) An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther*, **3**, 1010-1017.
- Lamaze, C. and Schmid, S.L. (1995) The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 573-580.
- Lear, J.D. and DeGrado, W.F. (1987) Membrane binding and conformational properties of peptides representing the NH2 terminus of influenza HA-2. *J Biol Chem*, **262**, 6500-6505.
- Lechardeur, D., Sohn, K.J., Haardt, M., Joshi, P.B., Monck, M., Graham, R.W., Beatty, B., Squire, J., O'Brodovich, H. and Lukacs, G.L. (1999) Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther*, **6**, 482-497.
- Lee, A., GAST AP, BUTUN V, ARMES SP. (1999) Characterising the structure of pH dependent polyelectrolyte block copolymer micelles. *Macromolecules*, **32**, 4302-4310.
- Lee, J.H.J., Tae Gwan Park. (2001) A new gene delivery of polyethylenimine/DNA complexes coated with PEG conjugated fusogenic peptide. *Journal of controlled release*, **76**, 183-192.
- Lemoine. (2002) Risks and benefits of gene therapy for immunodeficiency: a reality check. *Gene Ther*, **9**, 1561-1562.
- Li, E., Stupack, D., Klemke, R., Chersesh, D.A. and Nemerow, G.R. (1998) Adenovirus endocytosis via alpha(v) integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase. *J Virol*, **72**, 2055-2061.
- Li, G., Barbieri, M.A., Colombo, M.I. and Stahl, P.D. (1994) Structural features of the GTP-binding defective Rab5 mutants required for their inhibitory activity on endocytosis. *J Biol Chem*, **269**, 14631-14635.
- Li, G., D'Souza-Schorey, C., Barbieri, M.A., Roberts, R.L., Klippel, A., Williams, L.T. and Stahl, P.D. (1995) Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10207-10211.
- Li, S., Wu, S.P., Whitmore, M., Loeffert, E.J., Wang, L., Watkins, S.C., Pitt, B.R. and Huang, L. (1999) Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipidic vectors. *Am J Physiol*, **276**, L796-804.
- Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y.H., Cook, R.F. and Sargiacomo, M. (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol*, **126**, 111-126.
- Lopata, M.A., Cleveland, D.W. and Sollner-Webb, B. (1984) High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res*, **12**, 5707-5717.
- Lu, Y. and Low, P.S. (2002) Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv Drug Deliv Rev*, **54**, 675-693.
- Luby-Phelps, K., Castle, P.E., Taylor, D.L. and Lanni, F. (1987) Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 4910-4913.
- Ludtke, J.J., Zhang, G., Sebestyen, M.G. and Wolff, J.A. (1999) A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. *J Cell Sci*, **112**, 2033-2041.
- Lukacs, G.L., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N. and Verkman, A.S. (2000) Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem*, **275**, 1625-1629.
- MacLaughlin, F.C., Mumper, R.J., Wang, J., Tagliaferri, J.M., Gill, I., Hinchcliffe, M. and Rolland, A.P. (1998) Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J Control Release*, **56**, 259-272.
- Maniak. (2001) Macropinocytosis. *In Endocytosis*, 78-93.
- Matsui, H., Johnson, L.G., Randell, S.H. and Boucher, R.C. (1997) Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J Biol Chem*, **272**, 1117-1126.
- May, R.C. (2001) Phagocytosis in C. elegans: CED-1 reveals its secrets. *Trends Cell Biol*, **11**, 150.
- McBride, H.M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R. and Zerial, M. (1999) Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell*, **98**, 377-386.
- McLean, J.W., Fox, E.A., Baluk, P., Bolton, P.B., Haskell, A., Pearlman, R., Thurston, G., Umemoto, E.Y. and McDonald, D.M. (1997) Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice. *Am J Physiol*, **273**, H387-404.
- Merdan, T., Kopecek, J. and Kissel, T. (2002) Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev*, **54**, 715-758.
- Midoux, P., Kichler, A., Boutin, V., Maurizot, J.C. and Monsigny, M. (1998) Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconjug Chem*, **9**, 260-267.
- Midoux, P., Mendes, C., Legrand, A., Raimond, J., Mayer, R., Monsigny, M. and Roche, A.C. (1993) Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res*, **21**, 871-878.
- Midoux, P. and Monsigny, M. (1999) Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug Chem*, **10**, 406-411.
- Mislick, K.A. and Baldeschwieler, J.D. (1996) Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12349-12354.
- Montaguti, P., Melloni, E. and Cavalletti, E. (1994) Acute intravenous toxicity of dimethyl sulfoxide, polyethylene glycol 400, dimethylformamide, absolute ethanol, and benzyl alcohol in inbred mouse strains. *Arzneimittelforschung*, **44**, 566-570.
- Mukherjee, S., Ghosh, R.N. and Maxfield, F.R. (1997) Endocytosis. *Physiol Rev*, **77**, 759-803.

Bibliographie

- Nagarajan, S., Chesla, S., Cobern, L., Anderson, P., Zhu, C. and Selvaraj, P. (1995) Ligand binding and phagocytosis by CD16 (Fc gamma receptor III) isoforms. Phagocytic signaling by associated zeta and gamma subunits in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, **270**, 25762-25770.
- Nakano, M.Y., Boucke, K., Suomalainen, M., Stidwill, R.P. and Greber, U.F. (2000) The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. *J Virol*, **74**, 7085-7095.
- Neufeld, E.B., Cooney, A.M., Pitha, J., Dawidowicz, E.A., Dwyer, N.K., Pentchev, P.G. and Blanchette-Mackie, E.J. (1996) Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem*, **271**, 21604-21613.
- Newman, C.M., Lawrie, A., Briskin, A.F. and Cumberland, D.C. (2001) Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality. *Echocardiography*, **18**, 339-347.
- Nguyen, H.K., Lemieux, P., Vinogradov, S.V., Gebhart, C.L., Guerin, N., Paradis, G., Bronich, T.K., Alakhov, V.Y. and Kabanov, A.V. (2000) Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents. *Gene Ther*, **7**, 126-138.
- Niidome, T. and Huang, L. (2002) Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther*, **9**, 1647-1652.
- Nishikawa, M. and Huang, L. (2001) Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther*, **12**, 861-870.
- O'Riordan, C.R., Lachapelle, A., Delgado, C., Parkes, V., Wadsworth, S.C., Smith, A.E. and Francis, G.E. (1999) PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther*, **10**, 1349-1358.
- Ogris, M., Brunner, S., Schuller, S., Kircheis, R. and Wagner, E. (1999) PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther*, **6**, 595-605.
- Orlandi, P.A. and Fishman, P.H. (1998) Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol*, **141**, 905-915.
- Parente, R.A., Nadasdi, L., Subbarao, N.K. and Szoka, F.C., Jr. (1990a) Association of a pH-sensitive peptide with membrane vesicles: role of amino acid sequence. *Biochemistry*, **29**, 8713-8719.
- Parente, R.A., Nir, S. and Szoka, F.C., Jr. (1990b) Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. *Biochemistry*, **29**, 8720-8728.
- Park, I.K., Kim, T.H., Kim, S.I., Park, Y.H., Kim, W.J., Akaike, T. and Cho, C.S. (2003) Visualization of transfection of hepatocytes by galactosylated chitosan-graft-poly(ethylene glycol)/DNA complexes by confocal laser scanning microscopy. *Int J Pharm*, **257**, 103-110.
- Parton, R.G. and Simons, K. (1995) Digging into caveolae. *Science*, **269**, 1398-1399.
- Patki, V., Virbasius, J., Lane, W.S., Toh, B.H., Shpetner, H.S. and Corvera, S. (1997) Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7326-7330.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*, **3**, 473-483.
- Pfeffer, S. (2003) Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell*, **112**, 507-517.
- Pitt, A., Mayorga, L.S., Stahl, P.D. and Schwartz, A.L. (1992) Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest*, **90**, 1978-1983.
- Plank, C., Mechtler, K., Szoka, F.C., Jr. and Wagner, E. (1996) Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther*, **7**, 1437-1446.
- Plank, C., Oberhauser, B., Mechtler, K., Koch, C. and Wagner, E. (1994) The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem*, **269**, 12918-12924.
- Pollard, H., Remy, J.S., Loussouarn, G., Demolombe, S., Behr, J.P. and Escande, D. (1998) Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem*, **273**, 7507-7511.
- Pratten, M.K. and Lloyd, J.B. (1986) Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured in vitro. *Biochim Biophys Acta*, **881**, 307-313.
- Qualmann, B., Kessels, M.M. and Kelly, R.B. (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, **150**, F111-116.
- Racoosin, E.L. and Swanson, J.A. (1992) M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J Cell Sci*, **102**, 867-880.
- Raposo, G., Cordonnier, M.N., Tenza, D., Menichi, B., Durrbach, A., Louvard, D. and Coudrier, E. (1999) Association of myosin I alpha with endosomes and lysosomes in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, **10**, 1477-1494.
- Read, M.L., Etrych, T., Ulbrich, K. and Seymour, L.W. (1999) Characterisation of the binding interaction between poly(L-lysine) and DNA using the fluorescamine assay in the preparation of non-viral gene delivery vectors. *FEBS Lett*, **461**, 96-100.
- Remy-Kristensen, A., Clamme, J.P., Vuilleumier, C., Kuhry, J.G. and Mely, Y. (2001) Role of endocytosis in the transfection of L929 fibroblasts by polyethylenimine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta*, **1514**, 21-32.
- Reschel, T., Konak, C., Oupicky, D., Seymour, L.W. and Ulbrich, K. (2002) Physical properties and in vitro transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations. *J Control Release*, **81**, 201-217.
- Rittner, K., Benavente, A., Bompard-Sorlet, A., Heitz, F., Divita, G., Brasseur, R. and Jacobs, E. (2002) New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther*, **5**, 104-114.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R. and Anderson, R.G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, **68**, 673-682.
- Roy, K., Mao, H.Q., Huang, S.K. and Leong, K.W. (1999a) Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med*, **5**, 387-391.
- Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J.F. and Parton, R.G. (1999b) Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol*, **1**, 98-105.
- Rungsardthong, U., Deshpande, M., Bailey, L., Vamvakaki, M., Armes, S.P., Garnett, M.C. and Stolnik, S. (2001) Copolymers of amine methacrylate with poly(ethylene glycol) as vectors for gene therapy. *J Control Release*, **73**, 359-380.
- Rupper, A., Lee, K., Knecht, D. and Cardelli, J. (2001) Sequential activities of phosphoinositide 3-kinase, PKB/Akt, and Rab7 during macropinosome formation in Dictyostelium. *Mol Biol Cell*, **12**, 2813-2824.
- Sansonetti, P.J. (2000) Phagocytosis, a cell biology view. *J Cell Sci*, **113**, 3355-3356.
- Schmid, S.L., McNiven, M.A. and De Camilli, P. (1998) Dynamin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 504-512.
- Schnitzer, J.E., Oh, P., Jacobson, B.S. and Dvorak, A.M. (1995) Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca(2+)-ATPase, and inositol trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1759-1763.
- Sebestyen, M.G., Ludtke, J.J., Bassik, M.C., Zhang, G., Budker, V., Lukhtanov, E.A., Hagstrom, J.E. and Wolff, J.A. (1998) DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nat Biotechnol*, **16**, 80-85.

Bibliographie

- Shiah, J.J., Sun, Y., Peterson, C.M. and Kopecek, J. (1999) Biodistribution of free and N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-bound mesochlorin e(6) and adriamycin in nude mice bearing human ovarian carcinoma OVCAR-3 xenografts. *J Control Release*, **61**, 145-157.
- Sieczkarski, S.B. and Whittaker, G.R. (2002) Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol*, **83**, 1535-1545.
- Simoes, S., Slepishkin, V., Pires, P., Gaspar, R., de Lima, M.P. and Duzgunes, N. (1999) Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides. *Gene Ther*, **6**, 1798-1807.
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M. and Stenmark, H. (1998) EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*, **394**, 494-498.
- Somiari, S., Glasspool-Malone, J., Drabick, J.J., Gilbert, R.A., Heller, R., Jaroszeski, M.J. and Malone, R.W. (2000) Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol Ther*, **2**, 178-187.
- Somsel Rodman, J. and Wandering-Ness, A. (2000) Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci*, **2**, 183-192.
- Sosnowski, B.A., Gonzalez, A.M., Chandler, L.A., Buechler, Y.J., Pierce, G.F. and Baird, A. (1996) Targeting DNA to cells with basic fibroblast growth factor (FGF2). *J Biol Chem*, **271**, 33647-33653.
- Sparrow, J.T., Edwards, V.V., Tung, C., Logan, M.J., Wadhwa, M.S., Duguid, J. and Smith, L.C. (1998) Synthetic peptide-based DNA complexes for nonviral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **30**, 115-131.
- Subramanian, A., Ranganathan, P. and Diamond, S.L. (1999) Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells. *Nat Biotechnol*, **17**, 873-877.
- Suh. (1994) Ionization of poly(ethylenimine) and poly(allylamine) at various pH's. *Bioorg Chem*, **22**, 318-327.
- Swanson, J.A. (1989) Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *J Cell Sci*, **94**, 135-142.
- Sweitzer, S.M. and Hinshaw, J.E. (1998) Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*, **93**, 1021-1029.
- Tappe, H. and Sundler, R. (1995) Bafilomycin A1 inhibits lysosomal, phagosomal, and plasma membrane H(+)-ATPase and induces lysosomal enzyme secretion in macrophages. *J Cell Physiol*, **163**, 137-144.
- Taunton, J., Rowning, B.A., Coughlin, M.L., Wu, M., Moon, R.T., Mitchison, T.J. and Larabell, C.A. (2000) Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *J Cell Biol*, **148**, 519-530.
- Thilo, L., Stroud, E. and Haylett, T. (1995) Maturation of early endosomes and vesicular traffic to lysosomes in relation to membrane recycling. *J Cell Sci*, **108**, 1791-1803.
- Thurston, G., McLean, J.W., Rizen, M., Baluk, P., Haskell, A., Murphy, T.J., Hanahan, D. and McDonald, D.M. (1998) Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *J Clin Invest*, **101**, 1401-1413.
- Toncheva, V., Wolfert, M.A., Dash, P.R., Oupicky, D., Ulbrich, K., Seymour, L.W. and Schacht, E.H. (1998) Novel vectors for gene delivery formed by self-assembly of DNA with poly(L-lysine) grafted with hydrophilic polymers. *Biochim Biophys Acta*, **8**, 354-368.
- Tousignant, J.D., Gates, A.L., Ingram, L.A., Johnson, C.L., Nietupski, J.B., Cheng, S.H., Eastman, S.J. and Scheule, R.K. (2000) Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice. *Hum Gene Ther*, **11**, 2493-2513.
- Toyohara, A. and Inaba, K. (1989) Transport of phagosomes in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Sci*, **94**, 143-153.
- Trowbridge, I.S., Collawn, J.F. and Hopkins, C.R. (1993) Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol*, **9**, 129-161.
- Truant, R. and Cullen, B.R. (1999) The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol*, **19**, 1210-1217.
- Tseng, W.C., Haselton, F.R. and Giorgio, T.D. (1999) Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta*, **14**, 53-64.
- Ullman, E.F., Tamowski, T., Felgner, P. and Gibbons, I. (1987) Use of liposome encapsulation in a combined single-liquid reagent for homogeneous enzyme immunoassay. *Clin Chem*, **33**, 1579-1584.
- van de Wetering, P., Cheng, J.Y., Talsma, H., Crommelin, D.J. and Hennink, W.E. (1998) 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents. *J Control Release*, **53**, 145-153.
- van de Wetering, P., Moret, E.E., Schuurmans-Nieuwenbroek, N.M., van Steenberg, M.J. and Hennink, W.E. (1999) Structure-activity relationships of water-soluble cationic methacrylate/methacrylamide polymers for nonviral gene delivery. *Bioconjug Chem*, **10**, 589-597.
- van Deurs, B., Holm, P.K. and Sandvig, K. (1996) Inhibition of the vacuolar H(+)-ATPase with bafilomycin reduces delivery of internalized molecules from mature multivesicular endosomes to lysosomes in HEp-2 cells. *Eur J Cell Biol*, **69**, 343-350.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J. and Waterfield, M.D. (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem*, **70**, 535-602.
- Veithen, A., Cupers, P., Baudhuin, P. and Courttoy, P.J. (1996) v-Src induces constitutive macropinocytosis in rat fibroblasts. *J Cell Sci*, **109**, 2005-2012.
- Verbaan, F.J., Oussoren, C., van Dam, I.M., Takakura, Y., Hashida, M., Crommelin, D.J., Hennink, W.E. and Storm, G. (2001) The fate of poly(2-dimethyl amino ethyl)methacrylate-based polyplexes after intravenous administration. *Int J Pharm*, **214**, 99-101.
- Vergne, I., Constant, P. and Laneelle, G. (1998) Phagosomal pH determination by dual fluorescence flow cytometry. *Anal Biochem*, **255**, 127-132.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J. and Grinstein, S. (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J*, **366**, 689-704.
- Wadhwa, M.S., Collard, W.T., Adami, R.C., McKenzie, D.L. and Rice, K.G. (1997) Peptide-mediated gene delivery: influence of peptide structure on gene expression. *Bioconjug Chem*, **8**, 81-88.
- Wagner, E. (1998) Effects of membrane-active agents in gene delivery. *J Control Release*, **53**, 155-158.
- Wagner, E. (1999) Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **38**, 279-289.
- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M. and Birnstiel, M.L. (1992) Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7934-7938.
- Wattiaux, R., Laurent, N., Wattiaux-De Coninck, S. and Jadot, M. (2000) Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev*, **41**, 201-208.
- Weiss, B., Nitschko, H., Ghattas, I., Wright, R. and Schlesinger, S. (1989) Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs. *J Virol*, **63**, 5310-5318.
- Weissig, V., Lasch, J., Erdos, G., Meyer, H.W., Rowe, T.C. and Hughes, J. (1998) DQAsomes: a novel potential drug and gene delivery system made from Dequalinium. *Pharm Res*, **15**, 334-337.
- West, M.A., Bretscher, M.S. and Watts, C. (1989) Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol*, **109**, 2731-2739.