



HAL
open science

Conception et évaluation d'un vecteur ciblé de thérapie génique anticancéreuse destiné à la voie intraveineuse

Amélie Dufay Dufaÿ

► To cite this version:

Amélie Dufay Dufaÿ. Conception et évaluation d'un vecteur ciblé de thérapie génique anticancéreuse destiné à la voie intraveineuse. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114818 . tel-00737496

HAL Id: tel-00737496

<https://theses.hal.science/tel-00737496>

Submitted on 2 Oct 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ
PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE :

PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

ANNÉE 2011- 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1164

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 21/06/2012

par

Amélie DUFAÏ (WOJCICKI)

Conception et évaluation d'un vecteur ciblé de thérapie
génique anticancéreuse destiné à la voie intraveineuse

Directeur de thèse :

Elias FATTAL

Professeur (Université Paris-Sud XI)

Composition du jury :

Président du jury :

Catherine DUBERNET

Professeur (Université Paris-Sud XI)

Rapporteurs :

Sylvie BEGU

MCU (Université Montpellier 1)

Giuseppe DE ROSA

Chercheur (University of Naples Federico II, Italie)

Examineurs :

Christine CHARRUEAU

MCU (Université Paris Descartes)

Hervé HILLAIREAU

MCU (Université Paris-Sud XI)

**Conception et évaluation d'un vecteur ciblé
de thérapie génique anticancéreuse destiné à
la voie intraveineuse**

Je tiens à remercier en premier lieu mon directeur de thèse et mentor depuis la troisième année de pharmacie, le Professeur Elias Fattal. Son savoir, son expertise en vectorisation, et ses remarques avisées m'ont permis de mener à bien ce doctorat. Un grand merci également pour sa bienveillance et son accueil chaleureux dans l'équipe V Vectorisation des Molécules Fragiles.

Je tiens également à remercier le Docteur Hervé Hillaireau, grâce à qui ce manuscrit a grandement gagné en pertinence et qualité.

Je remercie le Docteur Sylvie Bégu et le Docteur Giuseppe De Rosa de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie également le Professeur Catherine Dubernet pour son écoute et son aide, ainsi que pour sa participation à ce jury. De même, je remercie le Docteur Christine Charrueau d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Un grand merci au Docteur Nicolas Tsapis pour ses conseils et son soutien, et au Docteur Amélie Bochot pour les discussions, scientifiques ou non, que nous avons pu avoir.

Merci aux Professeurs Christine Vauthier et Myriam Taverna pour leur encadrement lors des essais d'activation du complément et des expériences d'électrophorèse capillaire. Merci également au Docteur Mickaël Bourge pour son expertise en cytométrie de flux, et à Valérie Nicolas pour son aide sur le vidéomicroscope. De plus, je souhaiterais remercier le Docteur Silvia Arpicco pour le lipide DE et nos utiles échanges d'e-mails.

Merci au Docteur Marie Sophie Noël-Hudson et à Sandy Ribes pour avoir grandement facilité mon retour au laboratoire !

Je tiens à remercier particulièrement Olivier Cauchois, qui fut mon ange gardien du labo ! Et Céline Bouclier qui m'a ouvert la voie en biologie,

Un immense merci à Nadège Grabowski, Rym Skanji, Odile Diou, et Romain Canoni, pour les moments inoubliables avec vous au laboratoire. Merci à Nathalie Ménard avec qui j'ai beaucoup partagé depuis notre rencontre en deuxième année de pharmacie, jusqu'à aujourd'hui en thèse. Merci également à tous les membres passés ou actuels de notre équipe des « fragiles » et en particulier à Giovanna Giacalone pour son calme et sa gentillesse, à Vianney Delplace pour sa personnalité agréablement atypique, à Ludivine Mousnier pour sa sympathique compagnie dans le bureau, à Chantal Al Sabbagh pour sa bonne humeur.

Un merci particulier également à Valeria Arietti, Chiara Faedo et Claudio Surace, mais aussi à Lourena Mafra-Verissimo et Caroline Roques. Je pense également à d'autres personnes du laboratoire que je souhaiterais citer car ils ont compté chacun à leur manière : Samia Daoud, Simona Mura, Mounira Hamoudi, Régina Réul, Bénédicte Sacko-Pradines, Laura de Miguel, Silvia Mazzaferro et Sandrine Aka, Christelle Zandanel et Anne-Laure Ramon, Ludivine Bol, Patricia Livet, Hélène Chacun, Dominique Martin, Violetta Rodriguez Ruiz, Valentina Agostoni et Davide Brambilla, Nicolas Semiramoth et Fatouma Ali Said Hassane.

J'ai une pensée émue envers mes « amis de fac de pharma », Estelle et Bruno, Joëlle et Mickaël, Charlène et Sébastien, Isabelle et Stéphane, Florence, et Nathalie ainsi que vers mes « amis d'Issy », Hélène, Priscilla, Marianne, Naharisoa, Ludovic, Michaël, et pour Paul, Sandra et Nicolas(s).

Enfin un grand merci à ma famille, ainsi que ma belle famille qui m'ont soutenue pendant ces années de thèse.

A mon mari Sébastien et à ma fille Lucie

Conception et évaluation d'un vecteur ciblé de thérapie génique anticancéreuse destiné à la voie intraveineuse

L'administration intraveineuse d'ADN thérapeutique rencontre de nombreux obstacles liés à sa dégradabilité, ainsi qu'à sa difficulté à pénétrer les cellules en raison de sa taille importante et de son hydrophilie. Des lipoplexes conjugués à de l'acide hyaluronique (HA) de haut poids moléculaire ont été développés afin de délivrer de l'ADN plasmidique à l'intérieur de cellules cancéreuses exprimant le récepteur membranaire CD44, récepteur clé du développement tumoral. L'emploi d'HA conjugué au phospholipide DOPE (HA-DOPE) et d'un plasmide modèle GFP a permis d'obtenir des lipoplexes d'environ 250 nm, chargés négativement, protégeant efficacement l'ADN contre les nucléases et activant peu la fraction C3 du système du complément. Dans un modèle cellulaire exprimant CD44, la transfection optimale a été obtenue par l'utilisation de lipides avec 10% d'HA-DOPE complexés à de l'ADN selon un rapport 2:1. Ces lipoplexes sont internalisés par la voie des cavéoles et de façon dépendante du récepteur CD44. Cette formulation a été appliquée à la vectorisation d'un gène thérapeutique, codant pour le récepteur des estrogènes β (ER β), qui est un potentiel suppresseur de tumeur. Sur un modèle *in vivo* de xénogreffes de cellules humaines de cancer du sein estrogéno-dépendant et exprimant CD44, la diminution du volume tumoral, ainsi que de l'indice de prolifération Ki67 ont permis de montrer l'effet anticancéreux par voie intraveineuse des lipoplexes conjugués à l'HA.

Mots clefs : thérapie génique, lipoplexes, voie intraveineuse, acide hyaluronique, cancer

Design and evaluation of a targeted nanocarrier for anticancer gene therapy by intravenous administration

Intravenous administration of therapeutic DNA faces many obstacles related to its degradability and its difficulty to penetrate into the cells due to its large size and its hydrophilicity. Lipoplexes conjugated with high molecular weight hyaluronic acid (HA) have been designed in order to deliver plasmid DNA inside cancer cells expressing the membrane receptor CD44, a key receptor in the development of tumors. The use of HA conjugated to the phospholipid DOPE (HA-DOPE) and of the GFP model plasmid lead to obtain lipoplexes around 250 nm, negatively charged, which efficiently protect the DNA against nucleases and slightly stimulate the C3 fraction of the complement system. In a cellular model expressing CD44, the optimal transfection was obtained by using lipids containing 10% of HA-DOPE complexed to DNA at a 2:1 ratio. Internalization of these lipoplexes is mediated by the caveolae pathway and involves the CD44 receptor. This formulation was applied to the delivery of a therapeutic gene encoding the estrogen receptor β (ER β), which is a potential tumor suppressor. On an *in vivo* xenograft model of estrogen-dependent breast cancer cells expressing CD44, decrease of the tumor volume, as well as decrease of the Ki67 proliferation index, have shown the anticancer activity of the lipoplexes conjugated to HA following intravenous administration.

Keywords: gene therapy, lipoplexes, intravenous administration, hyaluronic acid, cancer

Introduction générale	16
Travaux antérieurs	19
I. La thérapie génique dans les traitements anticancéreux	19
A. Processus de cancérisation.....	19
1. Cancers cellulaires	19
2. Processus cancéreux et système immunitaire.....	20
3. Théorie des cellules souches cancéreuses	22
B. Intérêt de la thérapie génique dans les traitements anticancéreux	26
1. Principe de la thérapie génique	26
2. Identification de gènes thérapeutiques par recherche des gènes mis en cause dans le processus de cancérisation	28
a) Stratégies d'immuno-potentialisation	28
b) Stratégies par apport de gènes suicides	29
c) Stratégies de réparation des dérégulations du cycle cellulaire	29
II. ER β , un gène suppresseur de tumeur à potentiel thérapeutique	30
A. Généralités sur les récepteurs des estrogènes	30
1. Structure des récepteurs des estrogènes	31
2. Rôle de facteurs de transcription	32
a) Mécanisme génomique dépendant du complexe ER-ligand.....	32
b) Mécanisme génomique indirect dépendant du complexe ER-ligand	33
c) Mécanisme génomique indépendant du complexe ER-ligand.....	34
d) Mécanisme non génomique dépendant du complexe ER-ligand.....	34
B. Implications des récepteurs des estrogènes dans les cancers du sein estrogéno-dépendants	35
1. Balance ER α /ER β	36
2. Actions de ER β : lien avec le cycle cellulaire	37
III. Apport de la vectorisation pour la thérapie génique anticancéreuse par voie intraveineuse.....	40
A. Obstacles à l'administration de gènes thérapeutiques.....	40
1. Importance de la voie d'administration.....	40
2. Les barrières biologiques et leur contournement	41
B. Les différents types de vecteurs de gènes thérapeutiques	42
1. Vecteurs viraux et synthétiques.....	43

2. Les différents types de vecteurs synthétiques	43
a) Polyplexes	44
b) Lipoplexes	45
(1) Lipides cationiques utilisés dans les lipoplexes.....	45
(2) Intérêt du co-lipide DOPE	47
(3) Méthodes de préparation des liposomes/lipoplexes.....	48
C. Devenir du nanovecteur in vivo après administration par voie intraveineuse	51
1. Ciblage tumoral	51
a) Vecteurs de « première génération »	51
b) Ciblage passif des tumeurs : vecteurs de « deuxième génération ».....	53
c) Ciblage actif des tumeurs : vecteurs de « troisième génération ».....	56
2. Mécanismes d'internalisation cellulaire des vecteurs	57
3. Devenir subcellulaire.....	59
IV. Lipoplexes d'acide hyaluronique ciblant CD44, récepteur clé du développement tumoral	61
A. CD44, un récepteur de choix pour cibler les cellules souches cancéreuses.....	61
1. Rôles physiologiques et pathologiques	61
2. Diversité structurale et fonctionnelle	61
3. Partenaires extracellulaires et intracellulaires	62
4. Implication de CD44 dans les cellules souches cancéreuses.....	63
B. Utilisation de l'acide hyaluronique pour le ciblage de CD44	64
1. Généralités sur l'acide hyaluronique	64
2. Interactions avec CD44 : importance du poids moléculaire.....	65
a) Affinité.....	65
b) Activation des différentes voies de signalisation en fonction du poids moléculaire.....	65
3. Intérêts de l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire dans la formulation de liposomes et lipoplexes.....	66
a) Alternative à l'utilisation d'un anticorps	66
b) Affinité des formulations d'acide hyaluronique pour CD44	67
c) Alternative au PEG	68
V. Conclusions	70

Travaux expérimentaux	86
------------------------------------	----

Préambule	88
------------------------	----

« Lipoplexes targeting the CD44 hyaluronic receptor for efficient transfection of breast cancer cells .» Surace, Arpicco, Dufaÿ-Wojcicki, Marsaud, Bouclier, Clay, Cattel, Renoir, Fattal. Molecular Pharmaceutics (2009), 6(4) :1062-1073.

Chapitre 1: Application à un plasmide modèle

Hyaluronic acid-bearing lipoplexes: physico-chemical characterization and <i>in vitro</i> targeting of the CD44 receptor	101
I. Introduction.....	104
II. Materials and methods.....	105
A. Materials	105
B. Lipoplex preparation	105
C. Differential scanning calorimetry	106
D. Capillary electrophoresis	106
E. Diameter and zeta potential measurement.....	106
F. Gel migration assay	107
G. Protection against degradation by nucleases.....	107
H. Complement activation	107
I. Cell culture	108
J. Assessment of CD44 expression	108
K. Cell transfection	108
L. Endocytosis pathways	109
III. Results	110
A. Characterization of HA-DOPE lipoplexes.....	110
B. DNA stability and DNA-liposome interactions	112
C. Complement activation	113
D. Transfection of CD44-expressing A549 cells.....	113
E. Determination of endocytosis pathways.....	115
IV. Discussion	116
V. Conclusion.....	120

Chapitre 2 : Application à un plasmide d'intérêt thérapeutique

Vectorisation à l'aide de lipoplexes d'acide hyaluronique du gène ER β , potentiel suppresseur de tumeur dans les cancers du sein hormono-dépendants : caractérisation et activité anti-tumorale <i>in vivo</i>	127
I. Introduction.....	128
II. Matériels et méthodes.....	130
A. Caractérisation des lignées humaines de cancer du sein : ER α , ER β , et CD44.....	130
1. Recherche des transcrits ARNm par RT PCR.....	131
a) Extraction des ARN.....	131
b) Réaction de transcription inverse.....	131
c) Réaction de polymérisation en chaîne ou PCR.....	132
d) Analyse des produits de PCR par migration sur gel d'agarose.....	132
2. Expression protéique.....	133
a) Buvarpage à l'occidental ou Western blot.....	133
b) Analyse par cytométrie de flux.....	134
B. Préparation des lipoplexes.....	134
1. Obtention du plasmide.....	134
2. Préparation des formulations.....	135
a) Préparation du conjugué HA-DOPE.....	135
b) Préparation des lipoplexes.....	136
C. Mesure de diamètre et de potentiel zêta.....	136
D. Protection du plasmide vis-à-vis de la DNaseI : quantification absolue par qPCR grâce à un étalon externe homologue.....	137
E. Activité du plasmide ER β flag : validation de la construction plasmidique et conservation d'activité sous forme complexée aux liposomes cationiques.....	138
F. Test de viabilité cellulaire MTT.....	139
G. Transfection transitoire <i>in vitro</i>	139
H. Essais <i>in vivo</i>	140
1. Etude sur xénogreffes.....	140
2. Immunohistochimie.....	140
a) Etude de l'expression du marqueur de prolifération Ki67.....	141
b) Etude de l'expression du marqueur de néovascularisation des cellules endothéliales murines CD34.....	141

I. Essais complémentaires à l'IHC sur CD34 : Mesure de l'inhibition de la sécrétion du VEGF par l'expression de ER β	142
III. Résultats et discussion.....	142
A. Choix de la lignée cellulaire selon l'expression de ER α et de CD44	142
B. Caractérisations des lipoplexes	144
1. Diamètre et potentiel zêta.....	144
2. Protection vis-à-vis de la DNase I.....	145
3. Activité du plasmide ER β flag : validation de la construction plasmidique et conservation d'activité sous forme complexée aux liposomes cationiques	147
4. Détermination du seuil de toxicité des lipoplexes sur les cellules MCF-7 IAL149	
5. Transfection transitoire <i>in vitro</i>	151
C. Etude <i>in vivo</i> chez la souris nude à partir d'un modèle de xélogreffe de cellules humaines MCF-7 IAL.....	151
1. Courbes de croissance tumorale	151
2. Immunohistologie.....	153
a) Diminution de l'indice de prolifération Ki67	153
b) Diminution du marqueur de néovascularisation CD34	154
D. Essais complémentaires à l'IHC sur CD34 : Mesure de l'inhibition de la sécrétion de VEGF par l'expression de ER β <i>in vitro</i>	155
IV. Conclusion	158

Discussion générale	165
I. Contexte	165
II. Association du conjugué HA-DOPE aux lipoplexes	167
A. Affinité du conjugué pour les lipides	167
B. Formation des lipoplexes	168
C. Association de l'HA-DOPE aux lipoplexes	169
III. Formulation et évaluation de lipoplexes d'HA à l'aide d'un plasmide modèle	170
A. Caractéristiques physico-chimiques des lipoplexes	170
B. Efficacité de transfection <i>in vitro</i>	170
C. Potentiel de furtivité par mesure de l'activation du complément	171
D. Mécanisme d'internalisation cellulaire	172
IV. Application à la vectorisation du gène suppresseur de tumeur ER β	174
A. Comparaison des différents plasmides pour la formulation des lipoplexes	174
1. Comparaison des plasmides GFP/Luc/ER β	174
2. Comparaison des lipoplexes de rapport lipides:ADN de 2	175
B. Efficacité de transfection du gène ER β <i>in vitro</i>	176
C. Activité antitumorale sur un modèle de xénogreffe	177
V. Conclusion	179
VI. Perspectives	180

AF-1 ou 2	: Fonction Activatrice 1 ou 2
AP-1	: <i>Activator Protein 1</i> ou protéine activatrice 1
ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i> , centre de ressources biologiques
bp	: <i>base pair</i> (kpb, <i>kilo base pair</i>) ou paire de bases
CAF	: <i>Complement Activation Factor</i> ou facteur d'activation du complément
CD24	: <i>Cluster of Differentiation number 24</i> ou groupe de différenciation 24
CD44	: Cf. CD24
CDK	: <i>Cyclin Dependent Kinase</i> ou kinase dépendante de cycline
CE	: <i>Capillary Electrophoresis</i> ou électrophorèse capillaire
Chol	: Cholestérol
CMH	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	: CytoMégaloVirus
Cp	: voir Ct
CSC	: <i>Cancer Stem Cells</i> ou Cellules Souches Cancéreuses (ou TIC, <i>tumor initiating cells</i>)
Ct	: <i>Cycle threshold</i> ou cycle seuil, autrement appelé Cp pour <i>Crossing point</i>
D	: Diamètre
DBD	: <i>DNA Binding Domain</i> ou domaine de liaison à l'ADN
DE	: [2-(2-3didodecyloxypropyl)hydroxyethyl]ammonium bromide
DMEM	: Milieu Eagle Modifié par Dubelcco
DMRIE	: (1,2-dimyristyloxypropyl)(3-diméthylhydroxyethyl) ammonium bromide
DOPE	: L-alpha-DiOleylethanolamine
DOTAP	: 1,2-DiOleylethanolamine-3-TrimethylAmmonium-Propane
DSC	: <i>Differential Scanning Calorimetry</i> ou calorimétrie différentielle à balayage
E2	: Estradiol (dénomination commune internationale) ou oestradiol
EDTA	: Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i> ou facteur de croissance épidermique
EMT	: <i>Epithelial Mesenchymal Transition</i> ou transition épithéliale-mésenchymateuse
EPR	: <i>Enhanced Permeability and Retention</i> ou perméabilité et rétention accrues
ER	: <i>Estrogen Receptor</i> ou récepteurs des estrogènes
ERE	: <i>Estrogen Response Element</i> ou éléments de réponse aux estrogènes
ER α	: <i>Estrogen Receptor α</i> ou récepteur des estrogènes α
ER β	: <i>Estrogen Receptor β</i> ou récepteur des estrogènes β
ESR	: gène des récepteurs des estrogènes
EU	: <i>Endotoxin Units</i> ou unités d'endotoxines
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i> Cf. FCS
FCS	: <i>Fetal Calf Serum</i> ou sérum de veau foetal
FITC	: <i>Fluorescein IsoThioCyanate</i> ou isothiocyanate de fluorescéine
GFP	: <i>Green Fluorescent Protein</i> ou protéine verte fluorescente
HA-DOPE	: conjugué d'acide hyaluronique et de lipide DOPE
IHC	: ImmunoHistoChimie
IL-	: InterLeukine
Ki67	: marqueur de prolifération cellulaire
L:ADN	: (rapport) lipides:ADN
LBD	: <i>Ligand Binding Domain</i> ou domaine de liaison au ligand

Luc	: Luciférase
LUV	: <i>Large Unilamellar Vesicle</i> ou vésicule unilamellaire large
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> ou protéine kinase activée par des mitogènes
mCSC	: <i>metastatic Cancer Stem Cells</i> ou cellules souches cancéreuses métastatiques
MLV	: <i>MultiLamellar Vesicle</i> ou vésicule multilamellaire
motifs GC	: motifs Guanine Cytosine
MPS	: <i>Mononuclear Phagocyte System</i> ou système des phagocytes mononucléés
MTT	: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
MVV	: <i>MultiVesicles Vesicle</i> ou vésicule multi-vésicules
NTEI	: <i>Normalized Transfection Efficacy Index</i> ou indice normalisé d'efficacité de transfection
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i> ou tampon phosphate salin
PC	: PhosphatidylCholine
PCR	: <i>Polymerisation Chain Reaction</i> ou réaction en chaîne par polymérisation
PdI	: <i>Polydispersity Index</i> ou indice de polydispersité
PE	: PhosphatidylEthanolamine
PEG	: PolyEthylène Glycol
PEI	: PolyEthylèneImine
PI3K	: PhosphoInositide 3-Kinase
PKA ou C	: <i>Protein Kinase A</i> ou C
PS	: Pénicilline/Streptomycine
RES	: Système Réticulo Endothelial
RPMI	: milieu <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ou dodécylsulfate de sodium
si/shRNA	: <i>small interfering/short hairpin RNA</i> ou petit ARN interférant/en épingle à cheveux
SUV	: <i>Small Unilamellar Vesicle</i> ou petite vésicule unilamellaire
TGF β	: <i>Transforming Growth Factor β</i> ou facteur de croissance de transformation β
TIC	: voir CSC
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i> ou facteur de nécrose tumorale
TPA	: <i>TetradecanoylPhorbol Acetate</i>
TRE	: <i>TPA Response Element</i> ou élément de réponse au TPA
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
ZP	: <i>Zeta Potential</i> ou potentiel zêta

Introduction Générale

La thérapie génique repose sur l'utilisation d'un gène comme agent thérapeutique. Elle permet de cibler les causes d'une pathologie, que celle-ci soit due à la mutation d'un seul gène ou à un dérèglement plus complexe. Le développement de l'« ADN médicament » permet d'entrevoir de nombreuses possibilités de traitements performants. Le fait que les cancers soient dus à des dérèglements de l'homéostasie cellulaire propose de multiples choix de gènes candidats capables d'apporter, restaurer ou corriger une fonction. Etant donné que l'administration d'ADN par voie intraveineuse rencontre de nombreux problèmes liés à la dégradabilité ainsi qu'à la difficulté de l'ADN à pénétrer les cellules cibles en raison de sa taille importante et de son hydrophilie, une des clés de la réussite de la thérapie génique repose sur l'emploi de vecteurs. En effet, ces derniers sont capables de protéger l'ADN contre la dégradation et de favoriser son transport dans la cellule. De plus, la fonctionnalisation des vecteurs permet de cibler des cellules clés de la pathologie.

Notre laboratoire de Physico-chimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie, nouvellement « Institut Galien Paris Sud » (Université Paris Sud, UMR CNRS 8612), en collaboration avec le laboratoire de *Scienza e Tecnologia del Farmaco* (Université de Turin, Italie), a développé des lipoplexes conjugués à de l'acide hyaluronique (HA pour *hyaluronic acid*), basés sur l'emploi de liposomes cationiques complexant de l'ADN plasmidique. La conjugaison d'HA de haut poids moléculaire permet d'obtenir le ciblage actif du récepteur membranaire CD44 exprimé par les cellules souches cancéreuses, cellules clés du développement tumoral. Ces résultats, auxquels j'ai contribué, s'inscrivent dans le cadre du doctorat du Dr Claudio Surace et précèdent les travaux présentés dans ce manuscrit (Cf. préambule aux travaux expérimentaux).

Les objectifs de cette thèse sont dans un premier temps, d'optimiser la formulation des lipoplexes d'HA à l'aide d'un plasmide modèle GFP, d'en comprendre la physico-chimie, et de la relier à l'efficacité de transfection et aux mécanismes d'internalisation cellulaire. Dans un second temps, cette formulation a été appliquée *in vivo* à la vectorisation d'un plasmide thérapeutique ER β , potentiel suppresseur de tumeur dans les cancers du sein estrogéno-dépendants.

Ainsi ce travail a pour but de définir un vecteur de thérapie génique capable d'être injecté par voie intraveineuse, et d'atteindre des tumeurs solides.

Ce manuscrit est partagé en trois parties principales :

- dans les travaux antérieurs, nous présenterons premièrement la mise en place du processus cancéreux et les réponses pouvant être apportées par la thérapie génique. Deuxièmement, le contexte pathologique du cancer du sein estrogéno-dépendant sera présenté afin d'élaborer une stratégie thérapeutique mettant en jeu notre vecteur. Troisièmement, nous aborderons les intérêts de la vectorisation d'un gène. Et enfin, l'élaboration de notre stratégie de thérapie génique sélective, basée sur l'utilisation des lipoplexes furtifs d'acide hyaluronique ciblant le récepteur membranaire CD44, sera présentée.
- ensuite, après un préambule, les travaux expérimentaux permettront de caractériser l'association du conjugué d'HA aux lipoplexes, d'approfondir la compréhension de notre système en termes de rapport lipides:ADN, et de définir les aptitudes de transfection grâce à l'emploi d'un plasmide modèle codant pour la protéine GFP, ainsi que les mécanismes d'internalisation *in vitro*. Puis, l'utilisation du plasmide codant pour ER β illustrera les potentialités thérapeutiques de notre système *in vivo* dans un modèle de xénogreffe sous cutanée chez la souris.
- enfin, une discussion générale sur l'ensemble des travaux expérimentaux réalisés sera présentée avant de conclure et d'ouvrir sur les perspectives de ce travail.

Travaux Antérieurs

Après avoir décrit dans une première partie la mise en place du processus cancéreux, ainsi que les réponses pouvant y être apportées par la thérapie génique, nous aborderons dans la seconde partie de ces travaux antérieurs le choix d'un gène d'intérêt thérapeutique pour le traitement des cancers du sein estrogéno-dépendants. Ensuite les apports de la vectorisation d'un gène thérapeutique et les obstacles à son administration seront présentés, ainsi que les différents types de vecteurs existants et le cheminement du gène au sein du vecteur après administration intraveineuse. Enfin, la dernière partie présentera notre stratégie de thérapie génique, après avoir développé le choix de la cible cellulaire et de la molécule ciblante.

I. La thérapie génique dans les traitements anticancéreux

A. Processus de cancérisation

Le processus cancéreux est un dérèglement pathologique de l'homéostasie cellulaire, issu de la transformation de cellules à l'origine normales, liée à l'apparition de lésions génétiques, sous l'influence de facteurs héréditaires ou environnementaux.

1. Cancérisation cellulaire

La cellule devient cancéreuse lorsqu'elle présente un potentiel illimité de réplication, qu'elle est résistante à l'apoptose (mort cellulaire programmée) et devient insensible aux régulations homéostatiques. Ces caractéristiques ont pour origine notamment une perte de l'inhibition de contact et une perturbation des systèmes de contrôle du cycle cellulaire associée à une conservation des télomères (les télomérases présentes à l'état cancéreux reconstituent à chaque cycle cellulaire les télomères qui normalement raccourcissent au cours de la vie de la cellule).

Le cycle cellulaire des cellules de mammifères est divisé en quatre phases survenant selon un ordre établi (Cf Figure 1). La duplication de l'ADN s'amorce en phase G1 (*Gap* ou *Growth* phase 1) et s'effectue en phase S (Synthèse d'ADN). La mitose se prépare en phase G2 (*Gap* ou *Growth* phase 2) et se réalise en phase M (Mitose) pour aboutir à l'apparition de deux cellules filles comportant chacune la totalité des chromosomes. Chaque phase ne peut débiter que si la précédente est totalement terminée. La progression dans le cycle cellulaire est contrôlée par des processus d'interconversion. A chaque phase sont activées des sérines-thréonines kinases particulières, les kinases dépendantes des cyclines (CDK), dites catalytiques. Comme le nom des CDK l'indique, leur activité est dépendante de cyclines dites régulatrices. Les complexes CDK/cycline régulent l'avancement du cycle cellulaire sous le

contrôle d'inhibiteurs. Deux grandes familles d'inhibiteurs existent : les membres de la famille CIP/KIP, avec p21 et p27, qui inhibent la plupart des complexes CDK/cycline, et les membres de la famille INK4, avec notamment p15 et p16 qui interagissent spécifiquement avec CDK4 et CDK6 (Viallard *et al.*, 2001).

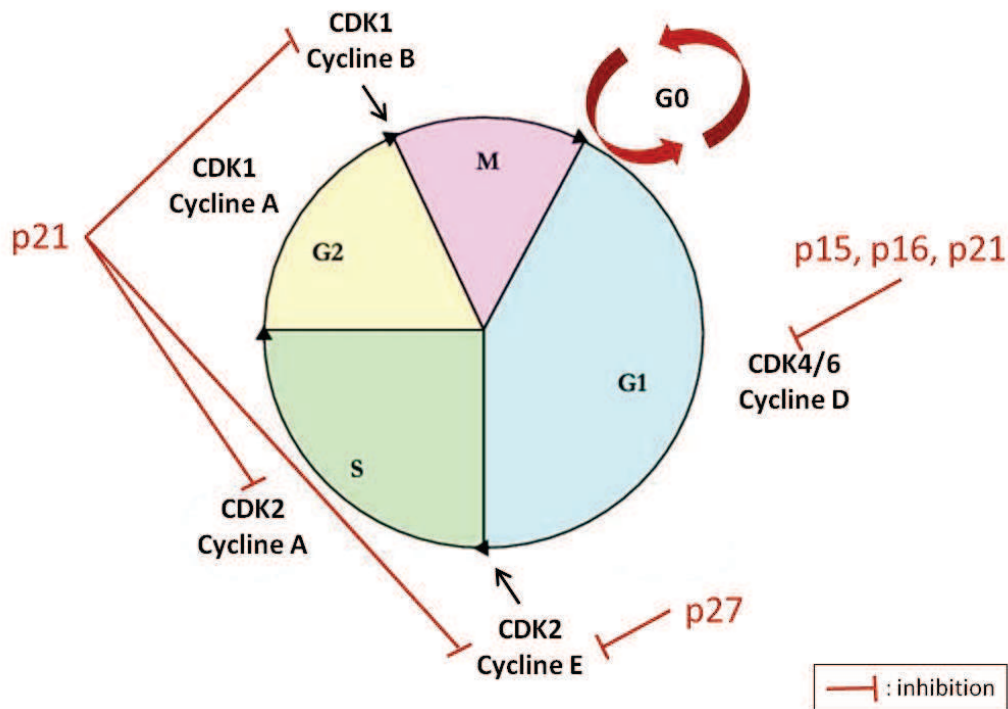


Figure 1 : Présentation des différentes phases du cycle cellulaire. G0 : quiescence, état de repos où la cellule ne prolifère pas ; G1 : synthèse d'ARN et de protéines, croissance cellulaire ; S : réplication de l'ADN ; G2 : préparation de la mitose ; M : mitose, séparation des chromosomes, division cellulaire. D'après (Robert 2006)

Chacun des composants de ce cycle peut être dérégulé au cours d'un processus cancéreux et participer ainsi à la cancérogénèse.

2. Processus cancéreux et système immunitaire

Face au processus cancéreux, la réponse immunitaire existe, et si elle est généralement qualitativement bien adaptée, elle est en revanche insuffisante quantitativement. Ainsi le développement de tumeurs est permis par l'absence de contrôle suffisant de la part du système immunitaire. L'immunité antitumorale se définit comme étant une réponse immunitaire de rejet, exigeant une destruction totale de la cible. Des antigènes spécifiques de tumeur ont été trouvés, montrant que cette défense de l'organisme au déclenchement d'un cancer existe bien.

Les mécanismes de cytotoxicité antitumorale s'enclenchent par la présentation d'une cellule cancéreuse *via* les cellules présentatrices d'antigènes, notamment les cellules dendritiques

présentant aux lymphocytes CD4⁺, en présence des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II, ou aux lymphocytes CD8⁺ en présence des molécules du CMH de classe I (Mocellin *et al.*, 2004). Les lymphocytes CD4⁺, après maturation en lymphocytes B, produisent des anticorps qui ont pour rôle la destruction de la cellule tumorale par les phénomènes d'ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) et de cytotoxicité dépendante du complément (Mocellin *et al.*, 2004). Il y a également sécrétion de cytokines (IL-2, IL-12) et activation des cellules dendritiques par les lymphocytes CD4⁺, ce qui conduit à l'expansion clonale des lymphocytes CD8⁺ (Gabrilovich 2004). L'activation des lymphocytes CD8⁺ aboutit à une action cytotoxique dépendante des lymphocytes T. L'activation de la voie Fas (voie responsable du déclenchement de mort cellulaire par apoptose) par complexe entre le Fas exprimé sur la cellule tumorale et le Fas ligand (Fas-L) des lymphocytes CD8⁺ conduit à l'activation des caspases et au déclenchement de l'apoptose. Les lymphocytes CD8⁺ injectent des perforines et granzymes activant la voie des caspases et conduisant à l'apoptose. Cette action est également réalisée par les cellules NK (*natural killer*). L'activation des lymphocytes CD8⁺ génère parallèlement une mémoire par le stock de lymphocytes CD8 activés (Mocellin *et al.*, 2004).

Cependant, malgré toutes ces réponses mises en œuvre par le système immunitaire, des phénomènes d'échappement liés à la coexistence de deux mécanismes peuvent surgir :

- Premièrement, une mauvaise induction de la réponse du système immunitaire de l'hôte peut se produire (Gabrilovich 2004). En effet, des inhibiteurs de la réponse inflammatoire tels que TGFβ, IL10, VEGF, prostaglandines sont sécrétés par la tumeur (Mocellin *et al.*, 2004). De plus, il y a une ignorance partielle de l'existence des antigènes tumoraux due à leurs localisations difficiles d'accès. Enfin une certaine tolérance s'installe.
- Deuxièmement, il y a une résistance des cellules tumorales aux cellules effectrices du système immunitaire caractérisée par une perte d'expression des molécules du CMH, une répression des gènes associés à la présentation de l'antigène, et un bas niveau d'expression des antigènes tumoraux associés à une perte d'épitopes (Gabrilovich 2004).

3. Théorie des cellules souches cancéreuses

a) Comprendre l'hétérogénéité des tumeurs primaires

Il existe une hétérogénéité de phénotypes et de capacités de prolifération au sein d'une seule et même tumeur (Pardal *et al.*, 2003) sans que ceci puisse s'expliquer par la seule transformation cancéreuse d'une cellule après mutation de gènes critiques. De même, toutes les cellules tumorales ne sont pas capables de générer une tumeur après injection sous-cutanée ; celles qui le peuvent sont appelées cellules initiateuses de tumeur (ou TIC en anglais pour *Tumor Initiating Cells*).

Deux modèles peuvent expliquer cette hétérogénéité (Reya *et al.*, 2001) :

- Tout d'abord le modèle d'évolution clonale à composante stochastique énonçant que toutes les cellules de la même tumeur sont potentiellement des TIC en fonction de l'apparition d'évènements aléatoires.
- La théorie hiérarchisée des cellules souches cancéreuses (CSC) précise quant à elle, que la tumeur est fonctionnellement hétérogène et que seule une sous population constitue les TIC (Dick 2003). Cette sous population de cellules tumorales a des phénotypes communs avec les cellules souches (Reya *et al.*, 2001; Pardal *et al.*, 2003).

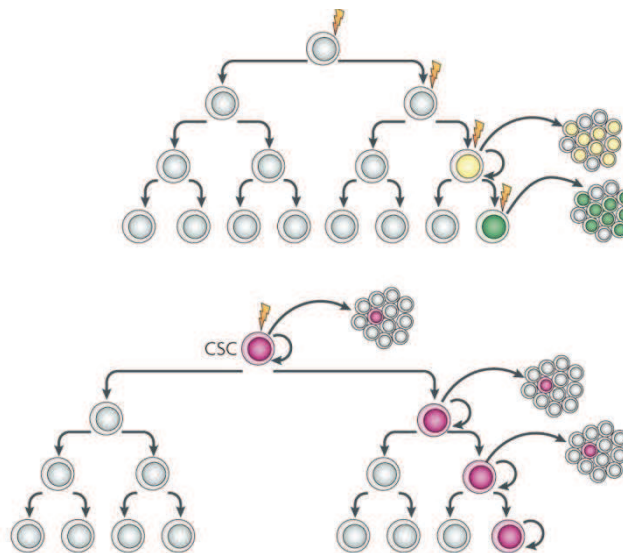


Figure 2 : Représentation des deux modèles permettant d'expliquer l'hétérogénéité d'une tumeur. Au dessus, le modèle d'évolution clonale à composante stochastique : les cellules tumorales sont hétérogènes, et toutes les cellules indifférenciées ont une capacité tumorigénique similaire et en dessous, la théorie hiérarchisée des CSC : les cellules tumorales sont hétérogènes et seulement la sous population de CSC a la capacité de générer des tumeurs (Visvader *et al.*, 2008).

A l'heure actuelle, même si certains s'interrogent encore (Shipitsin *et al.*, 2007), la théorie hiérarchisée des CSC est de plus en plus communément admise, et on parle indifféremment de CSC ou de TIC. Cependant, il faut préciser que certaines tumeurs solides répondent au modèle de l'évolution clonale (Visvader *et al.*, 2008).

Les CSC sont des cellules rares avec un potentiel de prolifération indéfini qui dicte la formation et la croissance des tumeurs (Reya *et al.*, 2001). Elles sont capables de générer les différentes cellules composant la tumeur (Visvader *et al.*, 2008). Les CSC sont responsables du développement de tumeurs primaires dans de nombreux cancers (sein (Al-Hajj *et al.*, 2003), leucémies (Bonnet *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 2006), cerveau (Singh *et al.*, 2003), poumons (Kim *et al.*, 2005), prostate (Collins *et al.*, 2005), colon (O'Brien *et al.*, 2007), pancréas (Li *et al.*, 2007), foie (Yang *et al.*, 2008), vessie (Chan *et al.*, 2009), ovaire (Curley *et al.*, 2009)), et également de métastases (Abraham *et al.*, 2005). En plus d'un phénotype partagé avec les cellules souches normales, les CSC ont des mécanismes semblables de régulation de leur auto-renouvellement. En effet, des voies de signalisation sont partagées comme Notch, Hedgehog, Wnt (Reya *et al.*, 2001), BMI1 (Pardal *et al.*, 2003; Visvader *et al.*, 2008). Certains définissent alors le cancer comme une maladie liée à un dérèglement de l'auto-renouvellement dans laquelle les mutations activent de façon inappropriée les voies de l'auto-renouvellement des cellules souches normales en machines de prolifération néoplasique (Pardal *et al.*, 2003). D'autres précisent que les CSC ne sont pas forcément issues de la transformation de cellules souches normales et pourraient être des cellules différentes qui acquièrent des capacités d'auto-renouvellement parallèlement aux cellules souches normales (Visvader *et al.*, 2008).

b) Les cellules souches cancéreuses et le développement de métastases

Toutes les cellules tumorales n'ont pas la capacité de former des métastases. Le potentiel métastatique dépend de multiples facteurs déterminant la croissance des cellules cancéreuses, leur survie, l'angiogénèse et l'invasion. Pour les tumeurs épithéliales, la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT, pour *epithelial-mesenchymal transition*), qui correspond à la dissociation du complexe jonctionnel intercellulaire, est considérée comme un événement crucial du processus métastatique, avec la suppression de l'homéostasie cellulaire épithéliale, ainsi que l'acquisition d'un phénotype migratoire mésenchymateux (Visvader *et al.*, 2008). Autrement dit les cellules reliées entre elles au sein de l'épithélium par différents types de jonctions, se retrouvent à l'état mésenchymateux rassemblées uniquement par la matrice

extra-cellulaire et sont prêtes à la migration. La dissémination métastatique peut être hématogène ou lymphatique. Les métastases se trouvant dans la circulation lymphatique peuvent créer des métastases ganglionnaires ou bien rejoindre la circulation sanguine.

Les tumeurs primaires développant des métastases comportent une plus grande fraction de cellules aux phénotypes $CD44^+/CD24^-$ (Abraham *et al.*, 2005; Tiezzi *et al.*, 2011). Les CSC primaires de cancer du sein exprimant fortement $CD44$ et faiblement, voire pas du tout, $CD24$, sont responsables de l'apparition des métastases (Liu *et al.*, 2007) ; Cependant, il semblerait qu'une fois arrivé au nouveau site, le phénotype $CD44^+/CD24^-$ se modifie en $CD24^+$ (Shipitsin *et al.*, 2007). Une population distincte de la population primaire de CSC est retrouvée au niveau des métastases : les CSC métastatiques (ou mCSC pour *metastatic Cancer Stem Cells*).

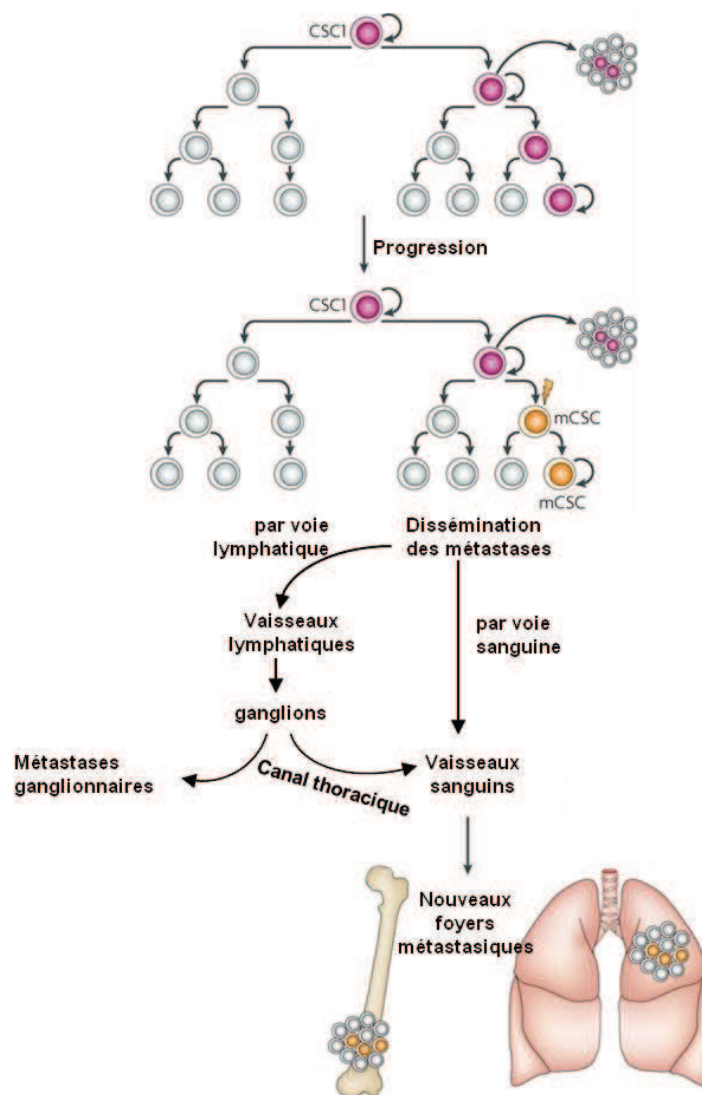


Figure 3 : Formation des métastases à partir de CSC. Au fur et à mesure que la tumeur progresse, une population de CSC ayant la capacité de métastaser peut émerger. Ces mCSC, caractérisant les métastases, s'échappent par voie sanguine ou lymphatique et créent de nouveaux foyers tumoraux au niveau de ganglions ou d'organes. Figure modifiée à partir de (Visvader *et al.*, 2008).

c) Implications thérapeutiques des cellules souches cancéreuses

Le concept des CSC a conduit certains auteurs comme Wicha à poser la question de la pertinence des thérapies actuelles : « *Are we targeting the right cells ?* » (Wicha *et al.*, 2006). Jusqu'à présent, la démarche était en effet de rechercher des agents capables de réduire au maximum la tumeur, par l'atteinte des cellules majoritaires de la tumeur c'est-à-dire celles qui sont déjà différenciées. Développer des agents ciblant les rares CSC pourrait entraîner la dégénérescence de la tumeur par la simple disparition des CSC.

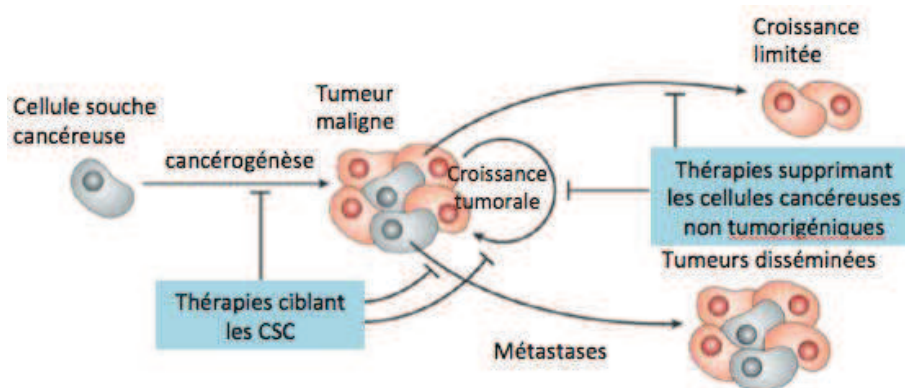


Figure 4 : Implications thérapeutiques de l'existence des CSC (Pardal *et al.*, 2003). Les CSC (en gris) s'autorenouvellent en CSC et se différencient en cellules cancéreuses non tumorigéniques (en orange) qui ont une capacité de prolifération limitée. Des thérapies capables de supprimer les CSC, d'induire leur différenciation ou de prévenir leurs métastases sont prometteuses. Des thérapies qui suppriment les cellules cancéreuses non tumorigéniques peuvent réduire la tumeur mais ne peuvent guérir le patient puisque les CSC subsistent.

Ces récentes théories mécanistiques des cancers sont à prendre en compte dans l'amélioration des thérapies anticancéreuses existantes. Certains auteurs vont jusqu'à espérer que la seule éradication des CSC permettrait la disparition totale du cancer (Reya *et al.*, 2001). Cependant, certaines caractéristiques des CSC peuvent compliquer leur éradication. En effet, les CSC, tout comme les cellules souches, expriment des protéines de résistance aux médicaments, comme MDR1 ou les transporteurs ABC (Pardal *et al.*, 2003). De plus, comme ces cellules se divisent lentement, elles peuvent échapper aux traitements conventionnels de chimiothérapie (Li *et al.*, 2008) et radiothérapie (Phillips *et al.*, 2006), et ce qui explique l'apparition de rechutes chez les patients. Il semblerait également que l'existence de CSC quiescentes permette une résistance aux agents chimiothérapeutiques (Visvader *et al.*, 2008). Il y a donc une nécessité de développer des thérapies ciblées spécifiques des CSC pour apporter une réponse performante aux traitements des cancers.

B. Intérêt de la thérapie génique dans les traitements anticancéreux

1. Principe de la thérapie génique

L'apport d'acide désoxyribonucléique ou ADN¹ dans le noyau d'une cellule offre à celle-ci de façon permanente ou non de nouvelles caractéristiques (Avery *et al.*, 1944). La thérapie génique consiste à utiliser l'ADN comme outil thérapeutique, afin qu'il apporte l'information génétique nécessaire à corriger, restaurer ou induire une fonction. C'est la production de la protéine, à partir de la séquence génomique donnée, qui apportera la fonction thérapeutique. Au lieu de se contenter de contrecarrer les symptômes pathologiques, la cause de la maladie est ciblée : c'est là la force d'une démarche thérapeutique par apport de gènes.

¹Les acides nucléiques sont des macromolécules hydrophiles stables chimiquement qui codent l'information génétique selon quatre différentes bases azotées (adénine, guanine, cytosine et thymine). Associées à un pentose, le désoxyribose, et à un phosphate, ces bases azotées forment un nucléotide. L'ADN est une séquence linéaire de nucléotides structurée en deux brins antiparallèles organisés en double hélice (Watson *et al.*, 1953). Ce codage conservé par réplication est transcrit en ARN puis traduit en acides aminés. L'enchaînement structuré d'acides aminés forme la protéine finale qui exécute la fonction codée par l'ADN de départ.

Deux aspects se rapportent à la thérapie génique :

- un premier aspect, qui ne sera pas développé ici, renvoie à une thérapie génique dite antisens basée sur l'inhibition de gènes par « interférence de l'ARN ». L'utilisation d'oligonucléotides antisens et si/shRNA (pour *small interfering/short hairpin RNA*) va empêcher l'expression de la protéine en visant son transcrit.
- le second aspect concerne l'apport de gène codant, par exemple, pour une protéine manquante ou déficiente. L'ADN plasmidique est une forme d'ADN exploitable pour l'apport de gènes thérapeutiques. En effet, un plasmide est une molécule d'ADN double brin circulaire capable de réplication autonome puisque comportant une origine de réplication propre et codant pour une protéine d'intérêt.

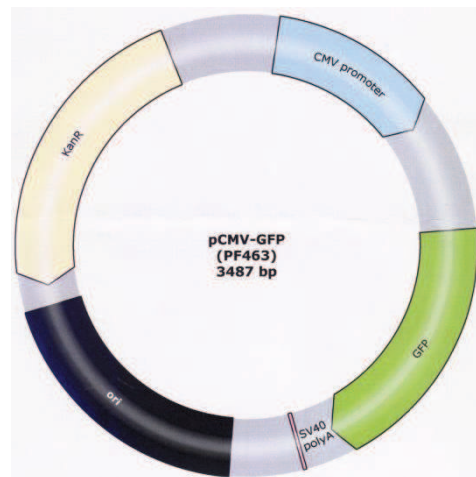


Figure 5 : Carte de restriction d'un plasmide codant la séquence de la *Green Fluorescent Protein* (GFP) sous le promoteur CMV qui contrôle son expression (source Plasmid Factory®). Le plasmide possède une séquence codante pour un gène de résistance à l'antibiotique kanamycine utile à sa production (sélection des clones bactériens possédant le plasmide), l'origine de réplication « ori » et la séquence de fin « polyA ». Ce plasmide est composé d'ADN double brin de 3487 paires de bases (bp pour *base pair*).

Le terme de « transfection » décrit le transfert de matériel génétique dans le noyau cellulaire. L'« expression du gène » renvoie à la protéine synthétisée par la machinerie cellulaire à partir de la séquence plasmidique.

La thérapie génique offre des possibilités de traitement dans de nombreux domaines : cancers, anomalies monogéniques (fibrose kystique, phénylcétonurie), maladies cardiovasculaires, maladies infectieuses, maladies inflammatoires, maladies neurologiques (Bally *et al.*, 1999).

2. Identification de gènes thérapeutiques par recherche des gènes mis en cause dans le processus de cancérisation

L'apparition d'une pathologie cancéreuse peut être liée à l'altération de « proto-oncogènes » (favorisant à l'état physiologique la prolifération cellulaire) ou de gènes dits « suppresseurs de tumeur » (capables à l'opposé de freiner la prolifération normale des cellules), pouvant provoquer une prolifération cellulaire respectivement par activation ou répression de ces mêmes gènes. Une troisième catégorie de gènes pouvant être impliquée dans l'apparition des cancers se rapporte aux gènes responsables de la réparation de l'ADN.

L'apport de gènes par des vecteurs synthétiques n'induit pas d'insertion du gène vectorisé dans le génome. Cela écarte tout risque de mutagenèse insertionnelle liée à des intégrations génomiques aléatoires. Si le but de la thérapie génique est l'apport d'une nouvelle fonction, cet aspect peut être considéré comme préjudiciable à une bonne efficacité du traitement. En revanche, dans la problématique des cancers, le traitement par un gène a souvent pour but la mort de la cellule tumorale. Il n'y a alors pas de nécessité à pérenniser l'expression de la protéine codée par le gène. Les différentes stratégies d'apport de gène thérapeutique pour le traitement des cancers, présentées ci-dessous, ont été décrites dans la revue citée ci-après (Rochlitz 2001).

a) Stratégies d'immuno-potentialisation

(1) Introduction de gènes codant pour des antigènes étrangers dans la tumeur

Des gènes codant pour des molécules étrangères au CMH, pour des antigènes viraux, ou pour des TSA (*tumor specific antigen*), s'ils sont connus, sont des exemples de stratégie visant à augmenter l'identification de la tumeur comme élément étranger.

(2) Introduction de gènes codant pour des cytokines

L'apport de gènes de cytokines telles que ceux de IL-2, IL-4, IL-7, IL-12 dans la tumeur a pour particularité de pouvoir augmenter localement l'immunogénicité de la tumeur.

(3) Introduction de gènes codant pour des cytokines stimulant les cellules de l'immunité

L'apport du gène du TNF α (*Tumor necrosis factor*) au sein de tumeurs infiltrées par des lymphocytes permet d'augmenter l'activité antitumorale des cellules de l'immunité. Cette

stratégie demeure une approche d'accompagnement d'une démarche plus large contrant la pathologie cancéreuse.

b) Stratégies par apport de gènes suicides

L'expression du gène codant pour la thymidine kinase du virus herpès simplex HSV-TK permet de conférer uniquement aux cellules de la tumeur, une activité thymidine kinase capable d'activer la prodrogue du ganciclovir contrairement à la même enzyme humaine. Ainsi, ce type de thérapie génique permet une action sélective du médicament.

c) Stratégies de réparation des dérégulations du cycle cellulaire

(1) Par inactivation d'oncogènes

Ce type de démarche ne s'intéresse pas à rétablir ou à donner un gène d'intérêt, mais à bloquer un oncogène (ayant un effet protumoral) par l'utilisation d'oligonucléotides antisens neutralisant par exemple les gènes *ras*, *c-myc* ou *bcl-2*.

(2) Par réactivation de gènes suppresseurs de tumeurs

Selon l'American Cancer Society, un suppresseur de tumeur est un gène qui est capable de diminuer les divisions cellulaires, de réparer les erreurs de l'ADN ou de dicter aux cellules leur mise en apoptose. Ainsi le gène codant pour p53, gardien du génome ou encore le gène de p16, inhibiteur de CDK (kinases dépendantes de cyclines) impliqués dans la progression du cycle cellulaire peuvent être cités comme exemple de gènes suppresseur de tumeur.

II. ER β , un gène suppresseur de tumeur à potentiel thérapeutique

L'apport de gène suppresseur de tumeur est une approche applicable et particulièrement prometteuse dans le cas du cancer du sein. Le cancer du sein constitue aujourd'hui la première cause de mortalité par cancer chez la femme (Ferlay *et al.*, 2010) : une femme sur dix en est atteinte. Malgré une efficacité croissante des différents traitements utilisés en clinique, le nombre de décès est en constante augmentation dans les pays occidentaux. De nombreux facteurs environnementaux et sociaux (polluants, alimentation, contraceptifs oraux, hormono-thérapie de substitution...) participent à cette augmentation. L'incidence et les taux de mortalité varient d'un facteur 4 en fonction de la localisation géographique. En 2005, l'Amérique du Nord et l'Europe du Nord recensaient les plus fortes incidences ; l'Europe de l'Ouest, l'Océanie, la Scandinavie et Israël montraient des taux intermédiaires ; enfin, les incidences basses étaient retrouvées en Amérique Latine et du Sud et en Asie (Althuis *et al.*, 2005). Récemment, une diminution des taux d'incidence a été observée en Europe du Nord (Bosetti *et al.*, 2011). Dans les pays industrialisés, la détection précoce des tumeurs par mammographie, ainsi que les avancées thérapeutiques ont permis d'augmenter la survie des patients (Althuis *et al.*, 2005). Pour la période 1989-1997, la survie relative à 5 ans était de 84% (Bossard *et al.*, 2007). La mise au point de nouveaux traitements ciblant plus spécifiquement les facteurs impliqués dans la pathologie représente un enjeu socio-économique primordial. Les cancers du sein sont classés en deux grandes catégories : les cancers hormono-dépendants (70 à 80% des cas d'après la Haute Autorité de Santé, dont la prolifération est sous la dépendance des hormones sexuelles féminines estrogènes et progestagènes, et les cancers hormono-indépendants.

A. Généralités sur les récepteurs des estrogènes

Les récepteurs aux estrogènes (ER) présentent deux isotypes : ER α (Greene *et al.*, 1986) et ER β (Kuiper *et al.*, 1996) (Mosselman *et al.*, 1996). Il existe de plus plusieurs isoformes pour chaque isotype dont cinq pour ER β (Moore *et al.*, 1998). Ce sont des récepteurs nucléaires qui sont des facteurs de transcription inductibles. Le niveau d'expression de ER α est très supérieur à celui de l'isotype ER β . Dans le cas des cancers du sein hormono-dépendants, l'estradiol exerce une action mitogénique par le biais d'une cascade d'évènements moléculaires résultant de sa liaison à un récepteur des estrogènes (ER α) majoritairement nucléaire. Depuis une dizaine d'années, de très nombreuses expériences réalisées *in vitro* et *in*

in vivo sur des modèles de xéno-greffes de cellules de cancer du sein estrogéno-sensibles suggèrent que ER β puisse jouer le rôle de suppresseur de tumeur.

1. Structure des récepteurs des estrogènes

Les gènes ESR codant pour ER α sont situés sur le chromosome 6 (Menasce *et al.*, 1993) et ceux de ER β , sur le chromosome 14 (Enmark *et al.*, 1997). Les distributions cellulaires de ER α et ER β sont distinctes et leurs cibles géniques différentes. Les protéines ER α et ER β possèdent 6 domaines distincts A/B, C, D, E, F, (Figure 1) requis pour exercer leur fonction de facteur de transcription (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Il existe deux domaines d'activation transcriptionnelle : l'un situé au niveau de la région terminale NH₂ qui contient la fonction activatrice AF-1 ligand-indépendante (régulée par phosphorylation), et l'autre au niveau terminale COOH qui contient la fonction AF-2 ligand-dépendante qui participe au recrutement de co-régulateurs (Schiff *et al.*, 2003; Lonard *et al.*, 2007)).

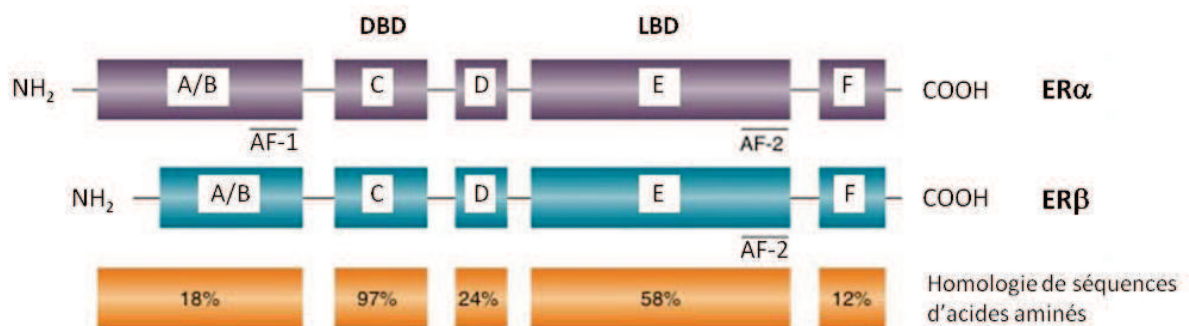


Figure 6 : Domaines structuraux des protéines ER α et ER β et pourcentages d'homologie de séquences d'acides aminés entre ER α et ER β par domaines (d'après (Hall *et al.*, 2005)).

La fonction AF-1 se trouve au niveau du domaine A/B de ER α . ER β quant à lui, ne possède que très peu d'activité AF-1. La fonction AF-2 se trouve sur le domaine E/F (ou LBD pour *Ligand Binding Domain*) formé d'une poche hydrophobe résultant, après liaison d'un ligand, du changement de positionnement de l'hélice α 12. Le pourcentage d'homologie de séquences pour le domaine E/F entre ER α et ER β est de 58% (Heldring *et al.*, 2007). AF-1 et AF-2 fonctionnent en synergie dans la plupart des cellules (Ring *et al.*, 2004).

Le domaine C (ou DBD pour *DNA Binding Domain*) est celui qui interagit avec des séquences spécifiques de l'ADN appelées éléments de réponse aux estrogènes (ERE ou *Estrogen Response Element*). Les séquences codant pour les domaines C respectifs de ER α et ER β possèdent 97% d'homologie et présentent ainsi la même affinité pour les ligands. Le domaine D, dit flexible (région charnière), permet les changements de conformation que le récepteur

subit lors de son activation. Enfin la région COOH terminale du domaine F semble jouer un rôle modulateur de l'activation de la transcription.

2. Rôle de facteurs de transcription

Les récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes régulent la transcription de leurs gènes cibles, après organisation en homodimères en se liant à des éléments de reconnaissance de séquences spécifiques de l'ADN, localisés au niveau des sites initiateurs de la transcription de ces gènes cibles (Gronemeyer *et al.*, 1995; Beato *et al.*, 1996).

Les multiples modes d'action de ER peuvent être décrits selon quatre mécanismes qui découlent de l'activation du récepteur après liaison à un ligand agoniste ou de sa phosphorylation. Cette activation peut être suivie d'effets transcriptionnels.

a) Mécanisme génomique dépendant du complexe ER-ligand

Les estrogènes (estrone (E1), estradiol (E2) et estriol (E3)) sont des hormones stéroïdiennes. Ils sont essentiels au développement ainsi qu'à la différenciation de l'appareil reproducteur et à une fertilité optimale. Ils possèdent également des propriétés neuro-, cardio- et ostéo-protectrices. Tout dérèglement dans leur production ou dans leurs effets intracellulaires peut conduire à la carcinogenèse du tissu cible. Grâce à leur nature lipophile, les estrogènes peuvent traverser passivement la bicouche lipidique de la membrane plasmique et se lier à leur récepteur intracellulaire. A l'état inactif sous forme de monomère, ER est retenu dans un complexe cytoplasmique lié à différentes protéines chaperons, et co-chaperons, organisé autour de la protéine de choc thermique hsp90. La liaison du ligand à son récepteur provoque une modification allostérique de la conformation du LBD avec réorganisation de l'hélice α 12. Ce changement est accompagné par un ensemble de phosphorylations par différentes kinases (MAP-K, PI3K, PKA, PKC, kinases dépendantes des cyclines (CDKs), etc..) qui vont phosphoryler certains acides aminés de ER comme, la sérine ou la tyrosine appartenant à différents domaines du récepteur (AF-1, LBD et DBD). Parallèlement, il y a dissociation des protéines chaperons et co-chaperons moléculaires, entre autres de la hsp90. Ces modifications entraînées par la liaison du ligand, déclenchent une homo- ou hétéro-dimérisation de ER. Ceci permet l'association de ce complexe, dans le noyau, aux séquences nucléotidiques palindromiques ERE situées à l'intérieur des régions promotrices des gènes cibles régulés par l'estrogène, ce qui a pour effet de moduler la transcription (Lonard *et al.*, 2007).

Le récepteur n'interagit pas directement avec l'ARN polymérase, mais en association avec d'autres facteurs de transcription, ainsi qu'avec un complexe coactivateurs/médiateurs qui façonne tous les signaux, pour les transmettre à la polymérase (Hall *et al.*, 2005). La phosphorylation de ER facilite alors le recrutement de protéines de co-régulation sur la fonction AF-2, qui interagissent avec les complexes ligand-récepteur liés à la séquence oligonucléotidique d'un promoteur (Tasset *et al.*, 1990).

On distingue les coactivateurs qui stimulent la transcription et les co-répresseurs qui la répriment. Parmi les coactivateurs, la famille des protéines p160, comprenant NCoA1 (ou SRC1), NCoA2 (ou TIF2 ou GRIP1), et NCoA3 (ou AIB1, TRAM1, RAC3 ou ACTR) activent ER en interagissant avec AF-2. On retrouve également le complexe SWI/SNF, protéine liant CREB, le facteur CBP/p300 (ou PCAF) et le complexe TRAP/DRIP/SMCC. Ces protéines s'associent séquentiellement, et de façon dynamique entre elles, ainsi qu'avec la machinerie transcriptionnelle de la cellule en formant de larges complexes, capables d'activer de façon synergique la transcription induite par l'œstrogène. De plus, nombreux sont les coactivateurs qui possèdent une activité histone-acétyl-transférase (HAT) permettant de décondenser la chromatine et par la même, augmenter les taux d'initiation de transcription. NCoR1 et NCoR2 (ou SMRT) sont des co-répresseurs responsables du recrutement de complexes histone-déacétylase (HDAC), conduisant à la condensation de la chromatine et diminuent ainsi le taux d'initiation de transcription (Ring *et al.*, 2004). Les ER sont capables de recruter des HAT et des HDAC en l'absence de ligand (Metivier *et al.*, 2003). C'est par ce type de mécanisme que le promoteur du gène de la cycline D1 est activé, expliquant l'effet mitogénique de l'E2 *via* ER α .

b) Mécanisme génomique indirect dépendant du complexe ER-ligand

De façon moins classique, ER peut s'associer à un facteur de transcription comme AP-1 (*Activator Protein-1*) qui est un hétérodimère de Fos/Jun ou un homodimère de Jun qui peut ensuite se fixer au site oligonucléotidique TRE spécifique de AP-1 de certains promoteurs et stimuler l'expression génique sans interagir directement avec l'ADN (Schiff *et al.*, 2003). De façon analogue, ER peut s'associer à Sp1 (*stimulating protein 1*) qui pourra exercer un effet par liaison à des régions de l'ADN riches en motifs GC (O'Lone *et al.*, 2004).

c) Mécanisme génomique indépendant du complexe ER-ligand

L'activité transcriptionnelle de ER peut être régulée en l'absence de ligand grâce à différents facteurs de croissance qui, en se liant à leur(s) récepteur(s) membranaire(s) (tyrosines kinases), activent une cascade de phosphorylations conduisant à la phosphorylation de ER. Ainsi, EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Falkenstein *et al.*, 2000) ou IGF-1 (*Insuline-Like Growth Factor-1*) (Ring *et al.*, 2004) sont capables d'activer séparément ER α via la voie des MAP-kinases après liaison à leur récepteur respectif. Ainsi, ces facteurs de croissance vont activer à leur tour la prolifération cellulaire.

d) Mécanisme non génomique dépendant du complexe ER-ligand

La voie non génomique est une voie par laquelle les estrogènes induisent des effets plus rapides qui ont lieu dans le cytoplasme et qui activent une cascade de kinases impliquant le recrutement d'une forme membranaire de ER α avec la PI3K. Cette dernière active d'une part, la famille des kinases Src, responsables de l'activation de la voie des MAP-kinases et de l'augmentation de la prolifération cellulaire et, d'autre part, la protéine kinase B (PKB) ou Akt, responsable de l'augmentation d'expression de la cycline D1 et de l'entrée en phase S des cellules (Castoria *et al.*, 2001).

La figure ci-après résume les quatre mécanismes qui viennent d'être décrits (Figure 7).

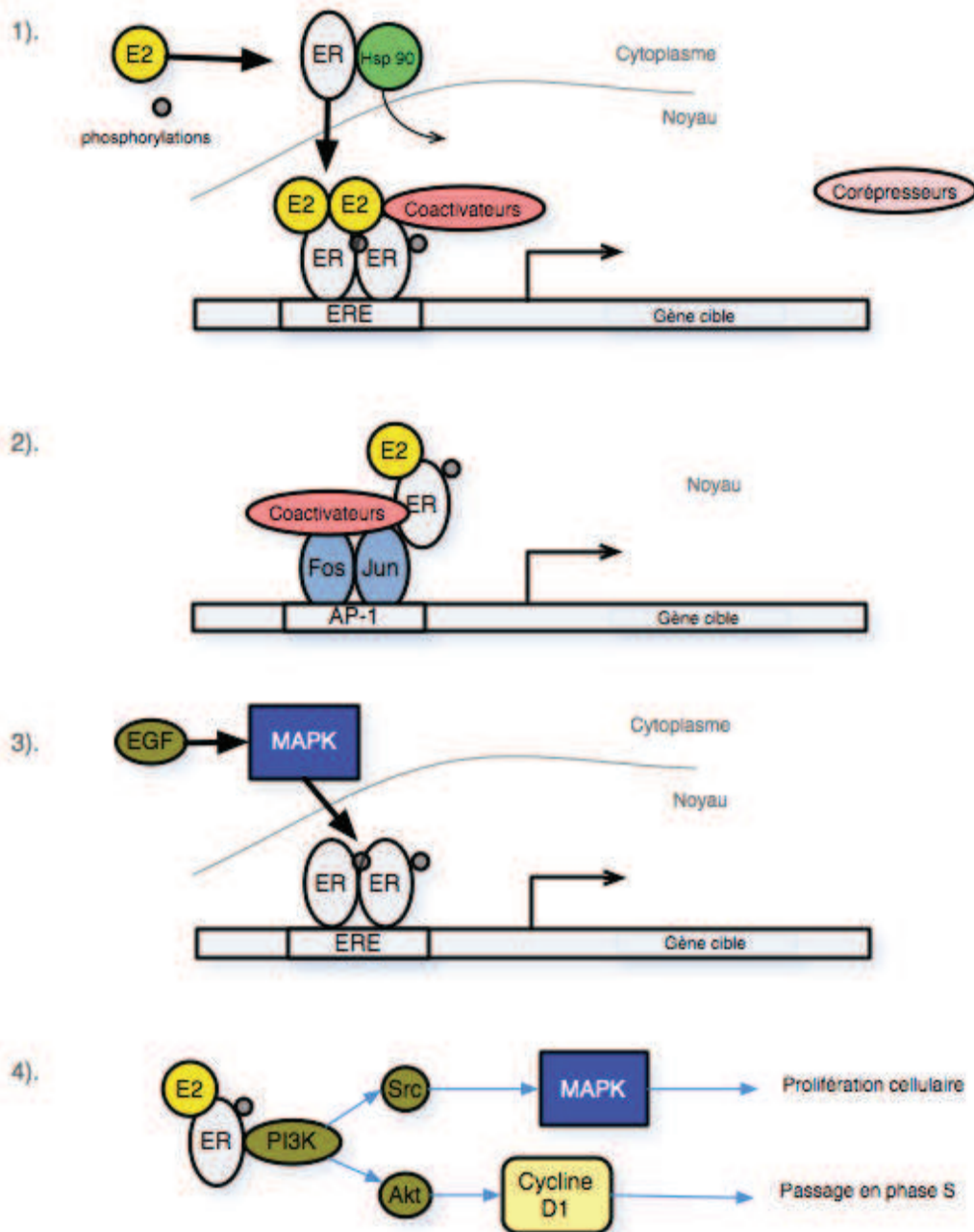


Figure 7 : Les quatre mécanismes d'actions des estrogènes (d'après (Schiff *et al.*, 2003; Ring *et al.*, 2004)).

B. Implications des récepteurs des estrogènes dans les cancers du sein estrogéno-dépendants

Il est nécessaire de distinguer différents cas de figure parmi les cancers du sein estrogéno-dépendants. A l'heure actuelle, le rôle de ER β apparaît différent, voir opposé, lorsqu'il n'est pas coexprimé avec ER α : il peut même partiellement remplacer ER α dans ce contexte (Lindberg *et al.*, 2003). En effet, une corrélation significative de l'expression d'ER β est observée avec le Ki67, marqueur de prolifération (Murphy *et al.*, 2006). De plus, en absence

de ER α , une expression accrue de ER β a été associée à une plus grande fraction de cellules en phase S du cycle cellulaire. Si ces observations venaient à se renforcer, ER β représenterait alors dans cette situation une cible thérapeutique de choix. C'est pourquoi, nous nous intéressons exclusivement au cas des cancers du sein estrogène-dépendants où ER α est exprimé. En effet, dans ce contexte, ER β est un potentiel suppresseur de tumeur (Paruthiyil *et al.*, 2004; Lazennec 2006; Treeck *et al.*, 2009; Paruthiyil *et al.*, 2011) particulièrement intéressant à apporter.

1. Balance ER α /ER β

En dehors de tout contexte cancéreux, les cellules qui prolifèrent n'expriment pas ou très peu ER α . Il a même été démontré que l'introduction de ER α entraînait l'arrêt de prolifération des cellules et parfois leur apoptose (Palmieri *et al.*, 2002). Il semblerait que ER α doit être réprimé pour que la cellule mammaire normale puisse progresser dans son cycle cellulaire. *A contrario*, à l'état cancéreux, des études effectuées *in vitro* sur des lignées de cancer du sein (MCF-7 et T47D exprimant ER α), montrent que les cellules prolifèrent en réponse à l'estradiol (Chalbos *et al.*, 1982; Dickson *et al.*, 1986). En clinique, le ratio ER α /ER β est significativement plus grand dans la tumeur du sein que dans les tissus normaux adjacents. Cette différence semble être due à une augmentation d'expression de ER α dans les cellules tumorales (Leygue *et al.*, 1998), combinée à une baisse de l'expression de ER β dans les cellules cancéreuses par rapport à celle retrouvée dans les cellules saines (Lazennec *et al.*, 2001). Dans un modèle murin de xénogreffes de cellules T47D exprimant ER α , l'introduction de ER β conduit à l'inhibition de la croissance et prévient une expansion de la tumeur en inhibant l'angiogénèse et la sécrétion de facteurs proangiogéniques tels que VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Hartman *et al.*, 2006).

De plus, ER β est de moins en moins exprimé au fur et à mesure de l'avancement du processus de carcinogénèse, comme l'ont révélé des analyses immunohistochimiques effectuées sur plus de 500 tumeurs de patients (Skliris *et al.*, 2003). En effet, il apparaît que le promoteur de ER β est souvent méthylé dans les cancers, notamment pour les cancers des ovaires (Suzuki *et al.*, 2008), ce qui conduit à une perte d'expression du récepteur. L'utilisation de shRNA contre ER β a conduit à la diminution du nombre de transcrits de p21 dans la lignée MCF-7. De plus, et surtout, l'inhibition de ER β a été suffisante pour induire une diminution du marqueur de différenciation des cellules épithéliales, la cytokératine 8. Or la perte de la cytokératine 8

marque la transition épithéliale mésenchymateuse évoquée précédemment, et signe une progression du cancer. C'est un élément de plus en faveur d'un rôle suppresseur de tumeur de ER β (Treeck *et al.*, 2009).

Dans le cas d'une coexpression ER β et ER α , il y a dominance négative de ER β sur ER α par formation d'un hétérodimère (Cowley *et al.*, 1997; Pettersson *et al.*, 1997) conduisant à réduire les effets transcriptionnels de ER α sur les gènes qu'il régule (Hall *et al.*, 1999; Lindberg *et al.*, 2003). L'estradiol possède une activité mitogénique *via* sa liaison à ER α et non *via* sa liaison à ER β (Lazennec *et al.*, 2001). Ainsi, ER β contrecarre la plupart des actions engendrées par ER α dans le cancer du sein (Chang *et al.*, 2006). L'effet modulateur de ER β s'exerce également en l'absence de ligand (Hall *et al.*, 1999). Le mécanisme de répression de ER α par ER β serait dû à une modification d'activité de la région AF-1 de ER α (Pettersson *et al.*, 2000).

La balance ER α /ER β est donc un élément très important dans la croissance cellulaire (Dahlman-Wright *et al.*, 2006; Renoir *et al.*, 2008). En effet, le ratio ER α /ER β constitue le paramètre décisif d'orientation du mécanisme transcriptionnel d'un gène cible en présence d'un ligand agoniste ou bien antagoniste. Le fait que le ratio ER α /ER β soit capable d'orienter le mécanisme transcriptionnel d'un gène cible et soit un élément très important dans la croissance cellulaire, combiné à la dominance négative de ER β sur les effets prolifératifs de ER α , ont amené l'équipe de J.A. Gustafsson à parler d'une relation "YingYang" entre ER α et ER β (Lindberg *et al.*, 2003), où ER α serait le « bad-guy » et ER β le « good-guy ».

2. Actions de ER β : lien avec le cycle cellulaire

ER β réprime l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Paruthiyil *et al.*, 2004; Strom *et al.*, 2004; Paruthiyil *et al.*, 2011). Ainsi, en régulant des composants du cycle cellulaire, il est capable d'inhiber la prolifération de différents types cellulaires (Thomas *et al.*, 2011). C'est à ce titre que ER β peut être défini comme un suppresseur de tumeur.

Le « gardien du génome », p53, est capable en augmentant l'expression de p21 d'arrêter les cellules endommagées en phase G1. Ainsi, des cellules déficientes en p53 ne peuvent répondre correctement à des lésions de l'ADN. Or la réexpression de ER β dans ces cellules perturbe le point de contrôle G2/M et induit leur apoptose (Thomas *et al.*, 2011).

ER β réprime la transcription des gènes c-myc, cycline D1 et cycline A induite par ER α dans des cellules MCF-7 indépendamment de l'estradiol. Les gènes des cyclines sont responsables de l'induction de la prolifération cellulaire comme expliquée précédemment et le gène c-myc quant à lui inhibe les protéines p21^{CIP1} et p27^{KIP1} dont le rôle est d'inactiver les CDK. Ainsi ER β , en réprimant ces gènes *via* la formation d'un hétérodimère avec ER α , favorise l'action antiproliférative de p21^{CIP1} et p27^{KIP1} et bloque l'action proliférative des cyclines D1 et A. Un arrêt du cycle cellulaire en G2 est alors observé (Paruthiyil *et al.*, 2004).

Des études *in vitro* menées dans des cellules de cancer du sein T47D montrent qu'un niveau d'expression équivalent de ER α et de ER β conduit à l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par E2 (Strom *et al.*, 2004). Concomitamment, il y a réduction des composants du cycle cellulaire associés à la prolifération (cycline E, Cdc25A (phosphatase indispensable à l'activation de CDK2), p45^{Skp2} (régulateur de la protéolyse de p27^{KIP1})) et une augmentation de p27^{KIP1} (inhibiteur des CDK). Une baisse de l'activité de CDK2 est également observée. Tout ceci confirme l'action opposée et dominante de ER β sur ER α . Ce même type de constat a été mis en évidence vis-à-vis de la cycline D1 (Liu *et al.*, 2002).

Enfin, ER β crée également un arrêt en G2 en inactivant CDK1, responsable de la progression de la phase G2 à la mitose durant le cycle cellulaire grâce à la répression de gènes codant pour la cycline B1 et par la stimulation de deux inhibiteurs de CDK1, GADD45A et BTG2 (Paruthiyil *et al.*, 2011)

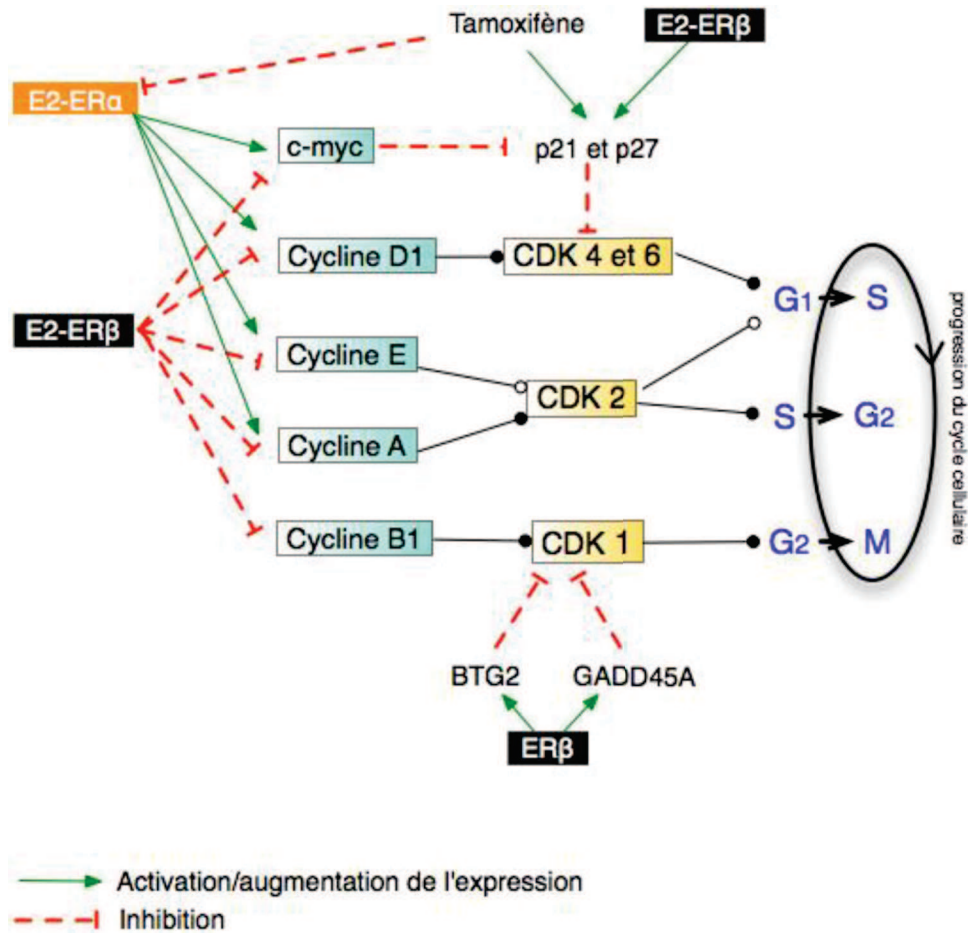


Figure 8 : Répression et activation de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, d'après (Johnson *et al.*, 1999), (Paruthiyil *et al.*, 2004), (Strom *et al.*, 2004) et (Paruthiyil *et al.*, 2011).

En conclusion, l'ensemble de ces éléments montre que ERβ est un candidat innovant de thérapie génique, potentiellement efficace dans les cas de cancers du sein hormono-dépendants de part son action de répression sur les gènes cibles de ERα et ses actions modulant la progression du cycle cellulaire.

III. Apport de la vectorisation pour la thérapie génique anticancéreuse par voie intraveineuse

A. Obstacles à l'administration de gènes thérapeutiques

1. Importance de la voie d'administration

Outre les démarches d'apport de gène par méthode *ex vivo* consistant à introduire, hors de l'organisme, les gènes thérapeutiques dans les cellules prélevées avant de les réimplanter, les différentes voies possibles pour l'administration *in vivo* d'un gène par voie parentérale sont les voies intraveineuse, sous-cutanée et intramusculaire (sans oublier la possibilité d'utiliser des voies parentérales particulières telles que les voies intradermique, intra-artérielle et intrarachidienne). La voie intraveineuse permet d'obtenir une activité thérapeutique sans délai, ni perte puisqu'elle s'affranchit de l'étape d'absorption du médicament. La prise en charge encadrée du patient lors d'un traitement à visée anticancéreuse atténue les inconvénients tels que la nécessité d'une effraction et d'un personnel soignant qualifié pour réaliser l'administration par voie iv, ainsi que les problèmes de baisse d'observance. Parmi les différentes voies parentérales, la voie sous-cutanée, permettant un passage dans la circulation lymphatique, pourrait être évoquée afin d'accéder aux métastases en migration dans les chaînes ganglionnaires, mais la forte présence de macrophages au niveau local (Oussoren *et al.*, 2001) et le faible drainage lymphatique tumoral ne permettent pas une bonne accessibilité des tumeurs et autres foyers de métastases. La voie intramusculaire, bien qu'intéressante car présentant peu de nucléases, est réservée à une action locale en thérapie génique ou à la synthèse de protéines d'intérêt qui atteindront ensuite le tissu cible. L'action systémique obtenue dans ce cas est donc limitée au relargage de protéines. La voie intraveineuse semble donc la plus appropriée dans le cas d'un traitement par thérapie génique anticancéreuse. Par ailleurs, c'est la principale voie d'administration utilisée dans les traitements classiques de chimiothérapie anticancéreuse. C'est pourquoi dans ce travail, nous nous sommes intéressés au transfert de gène *in vivo* par voie intraveineuse.

Les exigences associées à une préparation injectable pour la voie intraveineuse, d'après la 7^{ème} édition de la pharmacopée européenne, sont :

- l'absence de particules visibles ou non involontairement introduites dans la formulation et dans tous les cas, l'absence de particules microniques ou plus,
- l'innocuité des produits,

- la neutralité (souhaitable, mais non obligatoire grâce au fort pouvoir tampon du sang), l'isotonie (moins rigoureux si le volume injecté est faible, mais jamais hypotonique),
- la stérilité,
- l'apyrogénicité.

Le principal véhicule est l'eau ppi (pour préparation injectable).

Dans le cas d'administration d'ADN, des particularités existent : en effet, l'emploi de plasmides produits à partir de bactéries peut entraîner la présence d'endotoxines qui provoquent un effet pyrogène. De plus, assurer la stérilité des préparations à base d'ADN exige un travail en conditions aseptiques dès la manipulation des matières premières.

2. Les barrières biologiques et leur contournement

L'ADN plasmidique présente généralement une taille importante d'environ 3000 à 15000 pb (paires de bases) (Lasic 1997), soit une longueur de 1020 à 5100 nm (un pas de la double hélice d'ADN rassemble l'empilement de 10 paires de bases et mesure 3,4 nm ; le diamètre interne de la double hélice est de 2 nm). Cette taille importante et la charge négative due aux groupements phosphates sont des freins à la pénétration cellulaire. De plus, la dégradabilité de l'ADN libre par les nucléases est un obstacle supplémentaire à l'administration *in vivo* d'ADN. Pour contourner ces obstacles, la condensation et la protection de l'ADN deviennent les objectifs premiers dans la recherche de transporteurs. De plus, la durée d'expression de l'ADN apporté étant généralement courte, les transporteurs développés doivent être ré-administrables. Outre les aspects de protection du message à apporter, le vecteur doit réduire, voire annuler, la réponse inflammatoire (due en particulier aux nombreux motifs CpG non méthylés pouvant être présents dans les plasmides produits chez les bactéries, contrairement aux ADN provenant de mammifères (Zhang *et al.*, 2005)). Enfin il faut souligner qu'une administration d'ADN libre conduit généralement à une distribution non spécifique, à une dégradation rapide et à une faible internalisation cellulaire.

C'est pourquoi différentes méthodes d'apport de gènes ont été développées :

- les méthodes mécaniques de microinjection (*gene gun*),
- les méthodes physiques comme l'électroporation ou la sonication,
- les méthodes biologiques de transduction virale,
- les méthodes chimiques de transfection par des vecteurs synthétiques.

Les méthodes physiques s'adressent à des manipulations *in vitro*, tandis que les méthodes mécaniques nécessitent une taille minimale tumorale et une accessibilité suffisante des tumeurs pour obtenir une intervention précise. Contrairement aux méthodes mécaniques et physiques qui utilisent de l'ADN nu (pour revue Cf (Gao *et al.*, 2007)), les méthodes biologiques et chimiques font pénétrer l'ADN grâce à un agent vectorisant. La transduction concerne le transfert d'ADN par un vecteur viral par opposition au terme de transfection, qui est un transfert d'ADN effectué indépendamment d'un virus.

Les vecteurs utilisés sont capables d'apporter des réponses appropriées aux difficultés rencontrés par l'ADN nu grâce aux nombreuses modulations possibles. Le cheminement d'un vecteur de thérapie génique après administration intraveineuse, ainsi que la présentation des différents obstacles qu'il doit être capable de contourner afin d'obtenir une bonne expression du gène vectorisé, sont schématisés par la figure ci-dessous (Figure 9).

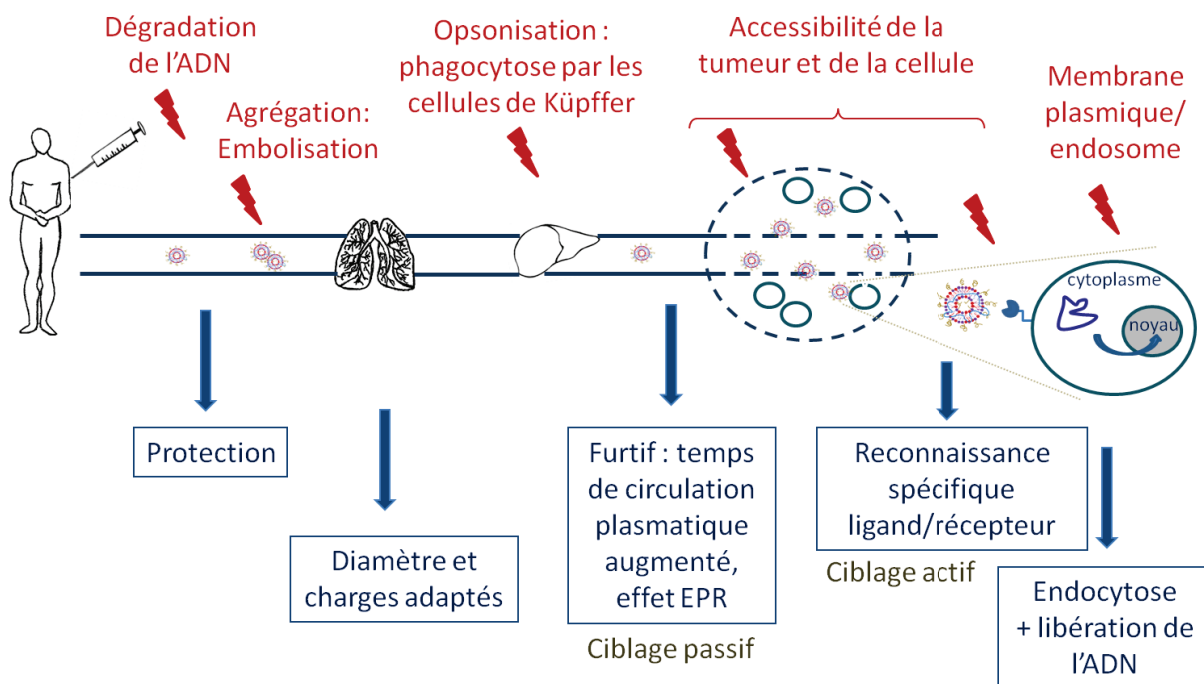


Figure 9 : Schéma récapitulatif des différents obstacles que le vecteur doit franchir (en rouge) grâce à ses caractéristiques intrinsèques (en bleu) : définition du cahier des charges de la formulation.

B. Les différents types de vecteurs de gènes thérapeutiques

Le concept de vectorisation repose sur le contrôle du devenir *in vivo* du médicament dans le but de cibler le site d'action pharmacologique au niveau tissulaire, cellulaire et subcellulaire. La vectorisation permet de rendre le devenir d'une molécule pharmacologiquement active

dépendante des caractéristiques physico-chimiques d'un vecteur (et non plus de ses propres caractéristiques).

1. Vecteurs viraux et synthétiques

On distingue les vecteurs viraux et les vecteurs synthétiques. Les vecteurs viraux sont des virus transformés : adénovirus, rétrovirus, lentivirus... A l'heure actuelle, ils représentent le type de vecteurs majoritairement développé pour délivrer l'ADN.

L'utilisation de lentivirus pour la transduction de cellules souches a fait la preuve de son efficacité en essais cliniques pour le traitement d'immunodéficiences primaires (Fischer *et al.*, 2011). Le type de lentivirus utilisé est dit « auto-inactivant », ce qui réduit les risques d'intégration génomique délétères. Plusieurs effets secondaires graves voir létaux ont néanmoins été décrits. Des essais précliniques prometteurs de traitement de la maladie de Parkinson par thérapie génique ont été réalisés chez le primate. Les gènes impliqués dans la biosynthèse de la dopamine ont été vectorisés par un lentivirus. Ce traitement a permis de restaurer les concentrations extracellulaires de dopamine et de corriger les déficits moteurs liés à la maladie de Parkinson (Jarraya *et al.*, 2009).

Les vecteurs viraux sont certes efficaces, mais l'introduction de particules virales dans l'organisme comporte des risques d'immunogénicité, rendant leur ré-administration souvent impossible car inefficace par installation d'une réponse immune. Il y a également des possibilités de recombinaison du virus vecteur avec un virus sauvage et des risques de cancérisation des cellules transduites. De plus, la production de tels virus est difficile, et enfin la taille des gènes vectorisables est limitée (Rochlitz 2001).

2. Les différents types de vecteurs synthétiques

En raison des nombreux obstacles existants pour administrer l'ADN seul et face aux problèmes liés à l'utilisation de vecteurs viraux, l'évolution de la thérapie génique s'est appuyée essentiellement sur le développement de vecteurs synthétiques : ils doivent induire la condensation de l'ADN afin d'en réduire la taille, de le protéger de la dégradation par les nucléases, d'assurer un ciblage sélectif de la cellule visée grâce à un système capable de reconnaissance, de permettre son internalisation et contrôler sa distribution subcellulaire. De plus, ces vecteurs doivent être les moins toxiques possibles pour l'organisme. Enfin ils ne doivent pas subir d'agrégation entre eux et maintenir un diamètre inférieur à 1000 nm pour éviter tout risque d'embolie, notamment au niveau des capillaires pulmonaires (5 μ m). De plus, afin d'autoriser une extravasation vers le tissu tumoral, les tailles doivent être de l'ordre

d'une centaine de nanomètres. On parlera pour ces vecteurs de taille nanométrique, de nanovecteurs ou de vecteurs nanoparticulaires.

En raison de la taille importante de l'ADN, comparée à celles des oligonucléotides ou des siRNA, son encapsulation à l'intérieur de nanovecteurs est difficile. C'est pourquoi des vecteurs capables par complexation à l'ADN d'induire leur condensation sont plus prometteurs. C'est le cas des vecteurs nommés polyplexes (comPLEXation de l'ADN par des POLYmères cationiques) ou lipoplexes (comPLEXation de l'ADN par des LIPides cationiques). Par interactions ioniques, un complexe est créé entre des éléments cationiques et les charges négatives des groupements phosphates des acides nucléiques, permettant ainsi une condensation de l'ADN (Gershon *et al.*, 1993). Ils n'ont pas de limite théorique de taille de plasmide à vectoriser. Ils sont de plus réputés peu immunogènes, ce qui permet les administrations répétées.

a) Polyplexes

Le composé le plus représentatif des polymères cationiques utilisés pour former des polyplexes est sans doute la polyéthylèneimine (PEI). C'est un polymère cationique soluble, protoné à pH physiologique, et de structure linéaire ou branchée. Il forme des complexes avec l'ADN (Boussif *et al.*, 1995; Choosakoonkriang *et al.*, 2003) de morphologie toroïdale ou « donuts » (Tang *et al.*, 1997). La formation des polyplexes se fait par simple ajout du PEI sur l'ADN (Boussif *et al.*, 1995). Le rapport PEI/ADN est généralement exprimé à l'aide du ratio N/P (*ie* amine du PEI/phosphate de l'ADN). Des polyplexes de taille nanométrique sont obtenus pour des ratios N/P supérieurs à 1 (Tang *et al.*, 1997) et un bon compromis entre la capacité de liaison aux cellules et la cytotoxicité est atteint aux alentours de 10 (Boussif *et al.*, 1995). Une fois internalisé dans la cellule, le vecteur s'échappe de l'endosome par rupture de celui-ci : ceci est dû à une augmentation de la pression osmotique à l'intérieur de l'endosome par effet « éponge à protons » du PEI qui entraîne un afflux de chlorure (Boussif *et al.*, 1995). Pour certains, il s'est révélé inefficace par voie intraveineuse (Jeong *et al.*, 2007). Cependant, de nombreux essais précliniques et cliniques (phases I et II), surtout pour des traitements anticancéreux, sont en cours de réalisation par la société Polyplus Transfection à l'aide de PEI (produit commercial « *in vivo*-jet PEI™ ») entre autres polymères cationiques. Les ratios N/P recommandés sont de l'ordre de 6 à 8 en essais *in vivo*. En revanche, la voie d'administration employée pour les seules informations disponibles au public, est la voie intravésicale (Sidi *et al.*, 2008), et non la voie intraveineuse.

Le chitosane, polysaccharide linéaire, est un autre polymère cationique utilisé pour la condensation d'acides nucléiques, qui forme des structures toroïdales (à l'aspect de pneu ou beignet) avec l'ADN permettant une protection vis-à-vis des nucléases comparables au PEI, tout en présentant une meilleure biocompatibilité. En revanche, à l'intérieur de la cellule, ces complexes peinent à s'échapper de la vésicule endosomale formée lors de leur internalisation (Merdan *et al.*, 2002).

Enfin, les dendrimères sont des polymères branchés et sphériques comportant de nombreuses amines capables de complexer l'ADN (Merdan *et al.*, 2002).

L'efficacité de tels systèmes polymériques dépend de leur aptitude à protéger l'ADN, ce qui est plus difficile à garantir qu'avec l'utilisation de bicouches autoassemblées (Lasic 1997). Ceci étant, ces systèmes sont de bons agents pour des voies présentant peu de nucléases comme la voie intramusculaire (Roques *et al.*, 2009), à condition qu'ils soient capables de relarguer convenablement le plasmide.

b) Lipoplexes

Des lipides cationiques sont utilisés de façon analogue aux polymères cationiques afin de créer un complexe par interactions de charges avec l'ADN. La détermination et la préparation de la formulation liposomale à base de lipides cationiques et de colipides, ainsi que la méthode d'obtention des lipoplexes par mise en contact avec l'ADN plasmidique vont être évoquées ci dessous.

(1) Lipides cationiques utilisés dans les lipoplexes

Il existe une grande variété de lipides cationiques en fonction de la nature des quatre domaines structuraux différents :

- une tête polaire chargée positivement, responsable des interactions ADN/lipides et lipides/cellules,
- un espaceur de longueur variable,
- un groupement de liaison,
- une queue hydrophobe jouant un rôle au niveau de la stabilité, de la biodégradabilité et de l'efficacité de transfection (Martin *et al.*, 2005).

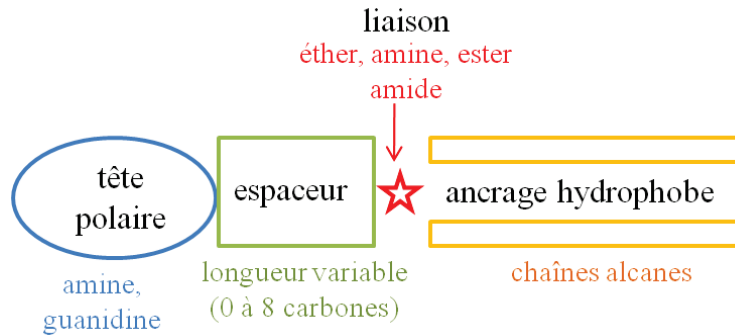


Figure 10 : Structure schématique d'un lipide cationique bicaténaire.

En milieu aqueux, ces lipides amphiphiles s'auto-organisent en structure supramoléculaire composée de bicouches lipidiques. Ils forment des lipoplexes lorsqu'ils sont mis en présence d'ADN.

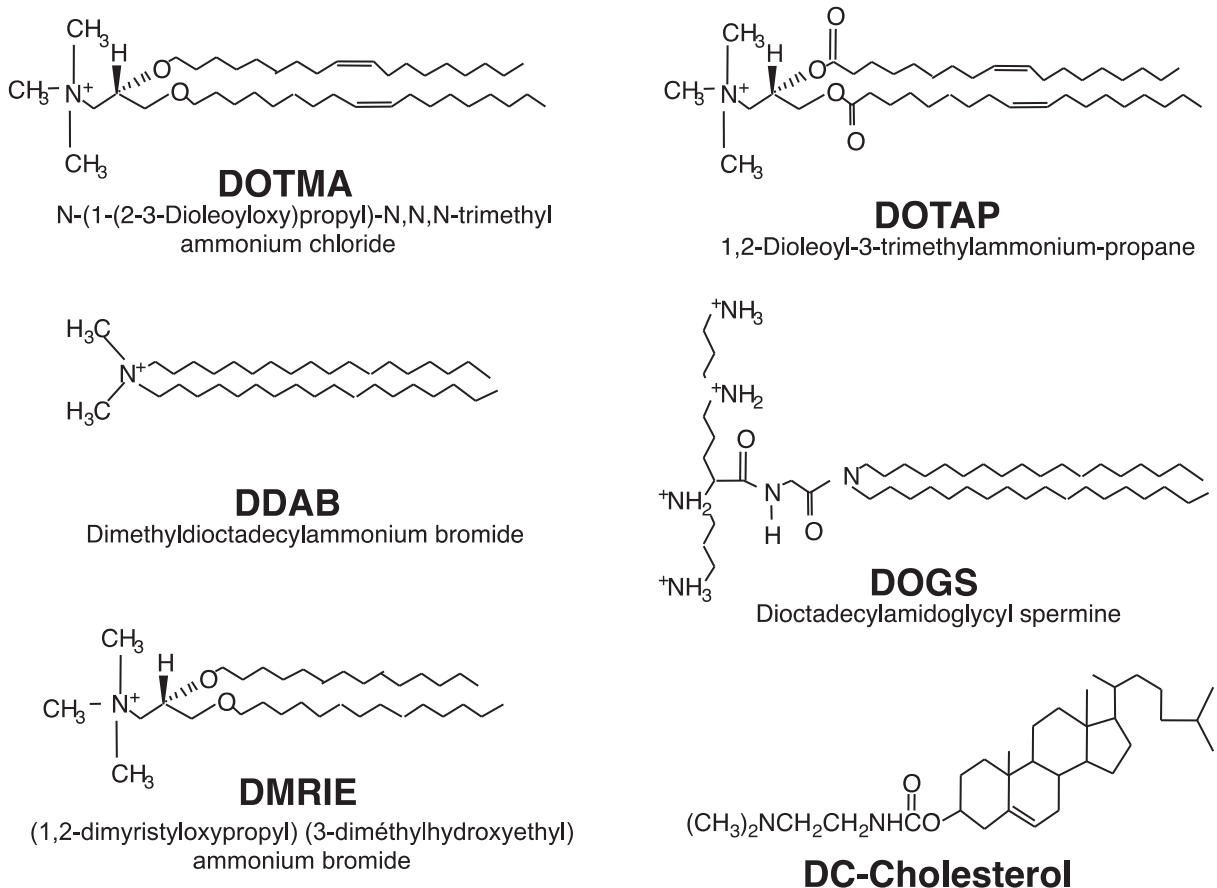
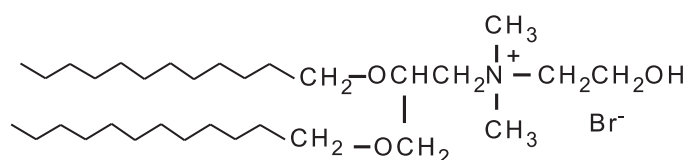


Figure 11 : Structures des lipides cationiques les plus courants.

Le DOTMA fut le premier lipide cationique utilisé en lipofection (transfection par le biais de lipides) (Felgner *et al.*, 1987). Une chaîne alkyle saturée courte induit une plus grande efficacité de transfection qu'une chaîne plus longue insaturée (Felgner *et al.*, 1994). Un lipide

cationique non commercialisé, le bromure de diméthylammonium 2-(2,3-didodecyloxypropyl)hydroxyéthyl (appelé DE), constitué de deux chaînes hydrocarbonées saturées en C12, a démontré une capacité de transfection prometteuse au sein de différentes lignées cellulaires (Arpicco *et al.*, 2004). L'espaceur présent au sein du lipide DE contient un atome de carbone et la tête polaire comporte un ammonium quaternaire lié à deux groupements méthyles et un groupement hydroxyéthyle (Figure 12).



DE

(2,3-didodecyloxypropyl) (2-hydroxyethyl) dimethylammonium bromide

Figure 12 : Structure du lipide cationique DE.

La structure du lipide DE est proche de celle du lipide DMRIE (1,2-dimyristyloxypropyl 3-dimethyl-hydroxyéthyl ammonium bromide). La tête polaire du DE comporte un groupement différent (hydroxyéthyle au lieu d'un méthyle) et les chaînes alcanes sont plus courtes (12 au lieu de 14).

(2) Intérêt du co-lipide 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3 phosphoéthanolamine (DOPE)

Les lipides cationiques sont très souvent associés au lipide DOPE (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3 phosphoéthanolamine) (Figure 13). C'est un lipide fusogène, dit « helper », car il permet des phénomènes de fusion membranaire, facilitant l'échappement de l'endosome (vésicule d'internalisation dans la cellule, Cf. endocytose présentée plus loin), et la dissociation de l'ADN du vecteur (Farhood *et al.*, 1995).

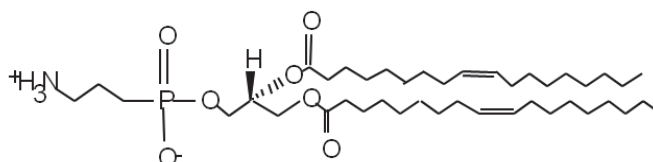


Figure 13 : Structure du lipide DOPE.

Le phosphate négatif de la DOPE forme un complexe stable par formation d'une paire d'ions avec le lipide cationique conférant une meilleure stabilité (Zuidam *et al.*, 1998). C'est pourquoi il est intéressant d'associer le co-lipide DOPE à des lipides cationiques au sein d'une même

formulation. De plus, le lipide DOPE permet d'éviter les inhibitions de transfection *in vitro* induites par certains glycoaminoglycanes anioniques comme l'héparane sulfate (Ruponen *et al.*, 2003). Notons que contrairement à l'héparane sulfate, l'acide hyaluronique ajouté dans le milieu de culture ne gêne pas la transfection des lipoplexes et donne même un taux d'expression du gène transfecté plus élevé.

Le lipide DOPE a été associé à de nombreux lipides cationiques, dont le lipide DE (De Rosa *et al.*, 2008). Cette association entraîne une réduction du diamètre des liposomes obtenus (Arpicco *et al.*, 2004).

(3) Méthodes de préparation des liposomes/lipoplexes

(a) Préparation de liposomes

Les différentes méthodes de préparation des liposomes sont (New 1990) :

- méthodes par dispersion mécanique (sonication, lyophilisation, utilisation d'un micro-fluidizer, cycles de congélation/décongélation...)
- méthodes par dispersion de solvant organique miscible ou non dans une phase aqueuse (injection d'éthanol, injection d'éther...)
- méthodes par solubilisation de détergents

Les méthodes les plus usitées sont présentées plus largement ci-dessous :

La méthode de préparation de Bangham par hydratation du film lipidique et dispersion mécanique peut être décrite par l'enchaînement suivant : les lipides sont mélangés dans une phase organique, puis le solvant organique est évaporé, conduisant à la formation d'un film lipidique. Ce film est ensuite hydraté par l'ajout d'une phase aqueuse, formant des MLV (MultiLamellar Vesicle) en suspension. Les liposomes ainsi obtenus peuvent être homogénéisés (voir plus bas).

L'évaporation du solvant organique peut s'effectuer par une évaporation rotative (cas du chloroforme), par une lyophilisation (cas du butanol tertiaire) ou par spray drying. Les lipides sont placés à une température supérieure à la T_c (température de transition phase gel/ phase liquide cristalline) du lipide ayant la plus haute T_c tout au long de la préparation. Les lipides sont hydratés par agitation vigoureuse. Le milieu d'hydratation des films lipidiques peut être de l'eau distillée, des solutions tampons, salines ou contenant des sucres à des concentrations iso-osmotiques. Mais dans le cas des lipoplexes, des milieux non ioniques sont utilisés (Bally *et al.*, 1999) de façon à ne pas écranter les charges des lipides cationiques et des acides

nucléiques. Les liposomes MLV obtenus peuvent ensuite être réduits en taille. Il existe par ailleurs des méthodes alternatives à cette méthode générale :

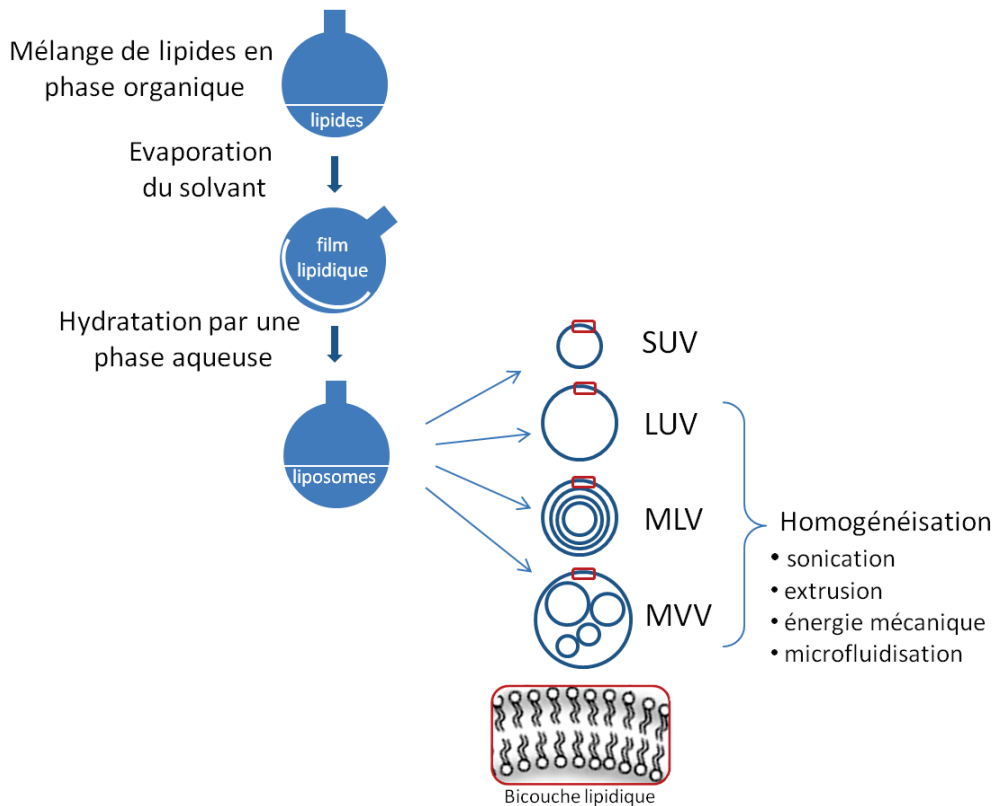


Figure 14 : Procédés de préparation des liposomes par hydratation de film et visualisation des différentes structures de liposomes obtenues (SUV, LUV, MLV, MVV).

Préparation par injection de solvants miscibles à l'eau

Les lipides sont dissous dans l'éthanol (Taetz *et al.*, 2009) notamment puis injectés dans une phase aqueuse sous forte agitation, suivi d'une dialyse ou diafiltration pour éliminer le solvant. Cette méthode permet l'obtention de SUV (Small Unilamellar Vesicle).

Préparation par déplétion de détergents (Lasic 1997)

Les lipides et autres composants sont solubilisés dans une solution de détergent fortement hydrosoluble comme l'octyl glucoside ou le cholate de sodium. Le détergent est ensuite retiré par dialyse, chromatographie gel ou par l'emploi de billes captant le détergent.

La polydispersité et/ou la taille des objets préparés peuvent être modulées par les trois techniques suivantes :

Sonication : les liposomes sont placés 5 à 10 minutes dans des bains à ultra-sons.

Extrusion : la suspension est entraînée par pression (70 bar) à travers des filtres composés de polycarbonate et présentant des tailles de pores décroissantes (allant de 1 μm à 50 nm selon le diamètre final recherché) par cycles successifs,

Microfluidisation : la suspension subit 3 à 5 passages à haute pression (1400 bar) à travers une chambre comportant un orifice de petite taille. Cette technique est la plus facilement industrialisable.

Il est à noter qu'une simple énergie mécanique peut suffire à déstructurer le MLV en LUV.

(b) Préparation de lipoplexes à partir de liposomes

L'ADN en solution aqueuse est ajouté à une suspension de liposomes préparés à partir de lipides cationiques. Les liposomes cationiques et l'ADN s'agrègent spontanément par l'intermédiaire de forces d'attraction électrostatiques (Felgner *et al.*, 1987). La complexation de l'ADN et des lipides cationiques induit une restructuration des liposomes et une localisation de l'ADN à l'intérieur de la structure (Gershon *et al.*, 1993). Il peut s'agir d'un arrangement en liposome multilamellaire ou bien d'une forme « agrégat » formée de superposition de bicouches de lipides séparées par le plasmide (Felgner 1996). La forme adoptée après la complexation entre les lipides cationiques et l'ADN n'est cependant pas connue avec certitude. Des problèmes d'agrégation peuvent apparaître selon la nature du lipide cationique utilisé, le type et la quantité de colipide associé, la composition des tampons utilisés, la méthode et le taux de mélange, la température à laquelle le mélange est fait, la pureté de l'ADN et le laps de temps après la formation du complexe (Bally *et al.*, 1999).

C. Devenir du nanovecteur *in vivo* après administration par voie intraveineuse

Une division en trois générations peut être établie en fonction des avancées de formulation qui ont pu être apportées. Ces améliorations galéniques peuvent être schématisées comme suit (Figure 15).

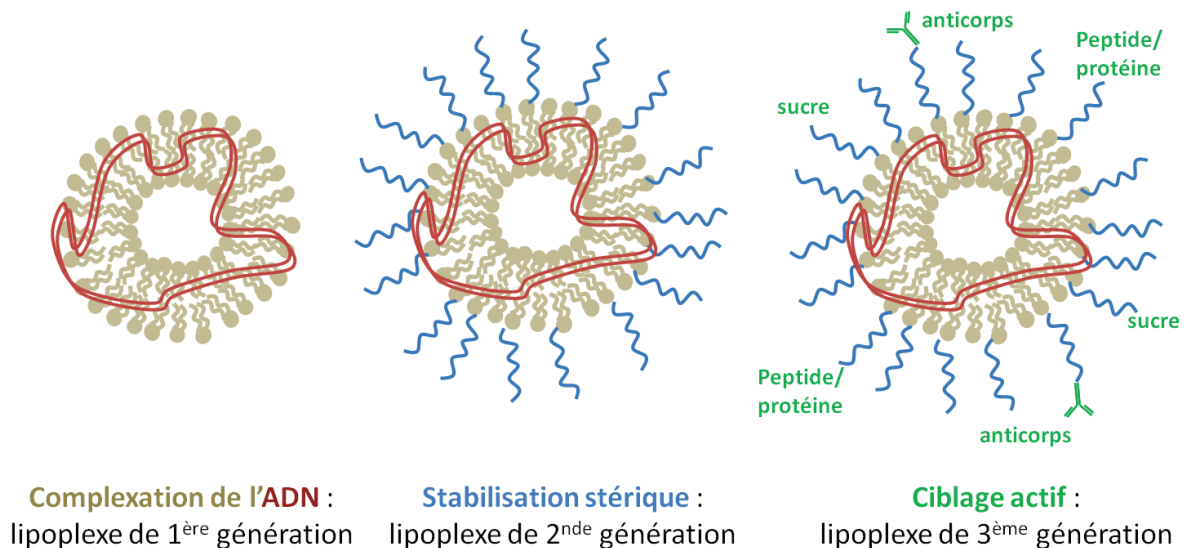


Figure 15 : Présentation schématique des améliorations apportées aux formulations de lipoplexes.

1. Ciblage tumoral

a) Vecteurs de « première génération »

Un vecteur, comme tout autre corps étranger, injecté dans la circulation, subit le phénomène d'opsonisation. L'opsonisation est l'adsorption de protéines sériques incluant les protéines du complément à la surface d'un élément, ce qui favorise sa phagocytose (absorption puis destruction). Le complément est un système de défense appartenant à l'immunité innée. A l'inverse, le terme de dysopsonisation se rapporte à l'adsorption de protéines sériques appelées dysopsonines, défavorables à la mise en place de la phagocytose. Ainsi, le processus de phagocytose est une résultante de la balance opsonines/dysopsonines. Si cette balance est favorable aux opsonines, les phagocytes mononucléés vont identifier l'élément opsonisé comme correspondant à du non soi et l'éliminer par phagocytose (ou capture macrophagique).

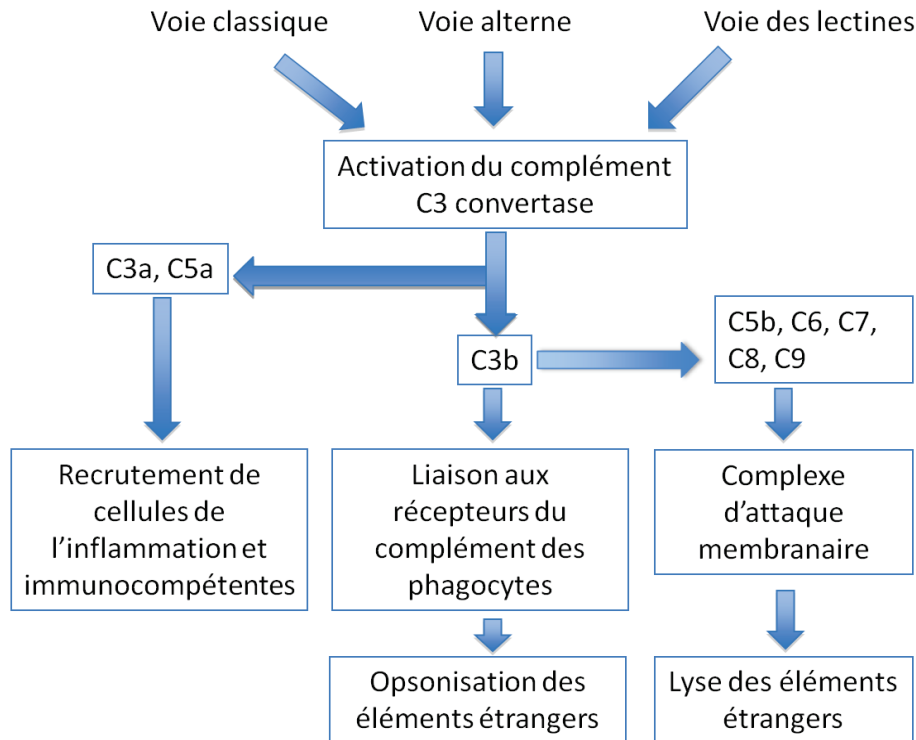


Figure 16 : Voies d'activation du complément : classique, alterne et par les lectines. Ces trois voies conduisent à la libération d'anaphylatoxines (C3a et C5a) qui permettent le recrutement de cellules immunitaires, et à la libération de fraction C3b qui favorise la phagocytose des éléments étrangers par les macrophages après opsonisation. Enfin ces voies conduisent également à la formation d'un complexe d'attaque membranaire responsable de la lyse de l'élément étranger par l'association des fractions C5 à C9.

Ainsi après administration intraveineuse, une clairance rapide des lipoplexes est observée. Environ 30% des lipoplexes injectés sont retenus au niveau des capillaires pulmonaires (en 1 minute à 2 h en fonction du lipide cationique), tandis que plus de 50 % sont phagocytés par les cellules hépatiques de Kuppfer (en 5 minutes à 4 h selon le lipide cationique). Il y a, de plus, une accumulation au niveau de la rate. En effet, l'interaction avec certaines protéines sériques crée des agrégats amenant à une accumulation dans le poumon par embolisation des capillaires pulmonaires. A titre de comparaison, le plasmide nu, quant à lui, est retrouvé à plus de 60% dans le foie en moins de 2 minutes, et moins de 10% est retrouvé au niveau des poumons (Zhang *et al.*, 2005). Il a été également montré sur un modèle de xénogreffe que des liposomes cationiques de DOTMA:Cholestérol (4:1) injectés en iv permettaient d'obtenir l'expression d'un gène (ratio molaire lipides:ADN 3:1) au niveau tumoral, et ce de façon croissante avec l'augmentation de la vascularisation de la tumeur. Mais, le niveau d'expression du gène au niveau tumoral est également 900 fois plus faible que celui dans les poumons (Anwer *et al.*, 2000). De plus, la présence des charges positives des lipoplexes favorise l'interaction avec les globules rouges, ce qui peut induire des hémolyses (Senior *et al.*, 1991).

Le fait que ces vecteurs soient captés par les macrophages hépatiques peut en revanche être mis à profit lorsqu'un ciblage du foie est souhaité. Toutefois, ces systèmes conventionnels que sont les lipoplexes de première génération, rencontrent lors d'une administration intraveineuse de nombreux obstacles amenant à diminuer leur efficacité et nécessitant de perfectionner leur formulation lorsque l'on souhaite cibler d'autres tissus que ceux du système réticulo-endothélial.

b) Ciblage passif des tumeurs : vecteurs de « deuxième génération »

Rapidement la croissance du foyer tumoral oblige la formation d'une néovascularisation. Cette angiogénèse permet à la tumeur de créer des échanges avec le reste de l'organisme afin de favoriser son développement. De plus, à mesure que la tumeur grossit, sa vascularisation augmente (Anwer *et al.*, 2000; Hashizume *et al.*, 2000). C'est l'existence de ces néovaisseaux qui va être exploitée pour une vectorisation passive. En effet, l'endothélium discontinu engendré par une croissance trop rapide et désordonnée des vaisseaux autour de la tumeur autorise l'entrée d'éléments allant jusqu'à des tailles de l'ordre de la centaine de nm.

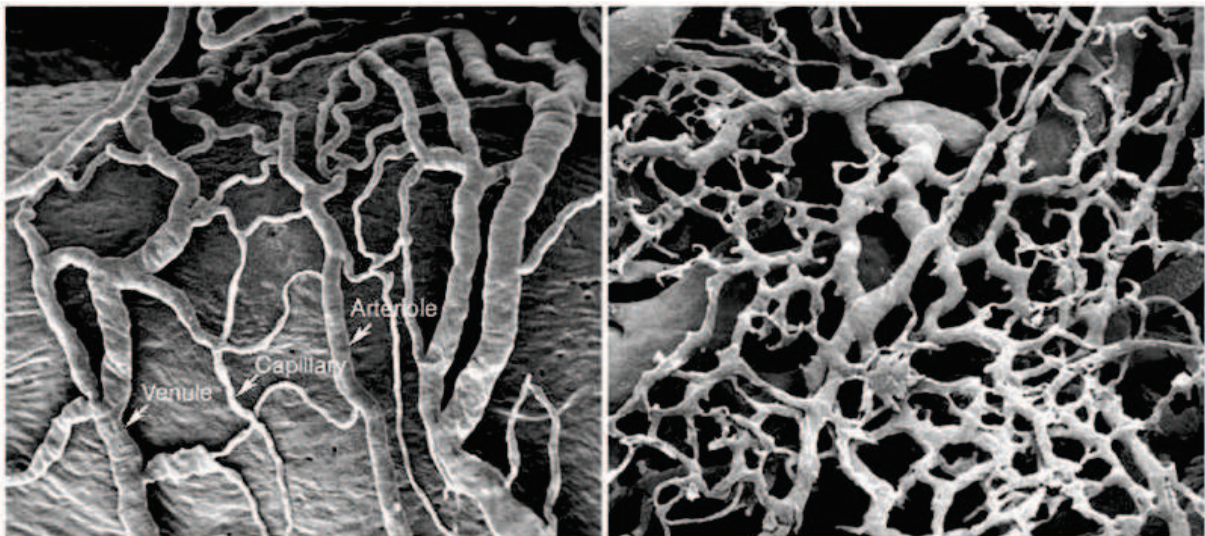


Figure 17 : Images de microscopie électronique à balayage montrant à gauche, un état de vascularisation normale organisée en arrangements d'artérioles, de capillaires et de vénules (chez le rat). À droite, sont présentées des images de la vascularisation d'une xénogreffe de tumeur humaine (chez la souris). La vascularisation présente dans ce cas, un état désorganisé et une impossibilité d'identification des artérioles, capillaires et vénules. Issues de (McDonald *et al.*, 2003).

D'autre part le drainage lymphatique localement peu développé ne permet pas l'« évacuation » de ces éléments. Ce phénomène de perméabilité et de rétention accrues (en anglais, effet EPR pour *Enhanced Permeation and Retention*) est indépendant de quelconque récepteur. On parle de ciblage passif. Afin de favoriser cette extravasation tumorale, l'élément

vectorisé doit pouvoir circuler longtemps dans les vaisseaux sanguins sans être intercepté par des acteurs immunologiques tels que les cellules de Küpffer au niveau du foie, et ne pas s'emboliser dans les fins capillaires pulmonaires.

(1) Eviter la baisse de biodisponibilité

Le contournement du processus d'opsonisation par l'adoption d'un caractère furtif permet d'éviter la capture par le système des phagocytes mononucléés ce qui a pour conséquence directe une persistance dans la circulation sanguine. Une solution générale est apparue après recouvrement des vecteurs par des chaînes de polymères hydrophiles comme le polyéthylène glycol (PEG) (Allen *et al.*, 1991). Les vecteurs répondant à cette approche peuvent être rassemblés sous l'appellation « vecteurs de seconde génération ». Pour exemple, des liposomes comportant du PEG 5000 présentent une clairance de plus de 30% plus lente que les liposomes sans PEG après administration intraveineuse chez la souris (Senior *et al.*, 1991). Le recouvrement s'effectue par greffage des chaînes de PEG sur un lipide qui sera inclus dans la bicouche liposomale (Woodle *et al.*, 1992). En fonction de la longueur de chaîne, et de la densité greffée, le polymère flexible forme une couche hydrophile à la surface du liposome (*periliposomal layer*) (Drummond *et al.*, 1999), créant ainsi une obstruction stérique et rendant impossible la formation d'interactions hydrophobes à la surface du vecteur (Papahadjopoulos *et al.*, 1991). Ainsi, l'adsorption des protéines opsonines à la surface des particules est contrée, et le temps de circulation dans le sang est augmenté puisqu'il n'y a plus d'interaction avec les macrophages (Allen *et al.*, 1991; Papahadjopoulos *et al.*, 1991). 24 h après injection iv chez la souris de liposomes comportant du PEG 5000, il est constaté que la circulation du vecteur est améliorée de près de 8000%, par rapport aux liposomes non recouverts, avec 25% de la dose initiale encore présente dans le compartiment sanguin (Blume *et al.*, 1990). D'autre part, une stabilisation par ajout de polymère hydrophile en surface est une solution pour empêcher les phénomènes d'agrégation par répulsion stérique.

Ceci étant, l'emploi de PEG est inadapté à cause de l'encombrement stérique qu'il confère aux agents de thérapie génique. Augmenter la proportion de lipides conjugués au PEG dans la formulation de lipoplexes diminue l'efficacité de transfection *in vitro* (Bally *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2002). Quelques petites améliorations ont pu être apportées par l'inclusion de charges anioniques dans la chaîne de PEG (Nicolazzi *et al.*, 2003). En effet, ces charges anioniques confèrent une plus grande stabilité dans le sérum, moins de transfection dans les tissus non

ciblés comme les poumons, mais sont sans bénéfice sur l'efficacité de transfection dans la tumeur (Nicolazzi *et al.*, 2003).

(2) Eviter une intolérance lié au vecteur

Il faut, lors de la formulation des vecteurs synthétiques, prendre en compte les mécanismes impliqués dans leur immunotoxicité (Jiskoot *et al.*, 2009) (même s'ils sont par nature moins immunotoxiques que les vecteurs viraux). En effet, après injections répétées du vecteur, un phénomène de clairance sanguine accélérée (effet ABC (*accelerated blood clearance*)) peut se mettre en place par reconnaissance par le système RES (système réticulo-endothélial). Des anticorps apparaissant à la première injection pourraient être responsables de cet effet ABC abaissant ainsi la biodisponibilité de l'élément vectorisé (Jiskoot *et al.*, 2009). De plus, les liposomes de charges de surface négatives peuvent être responsables de l'activation aussi bien que de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. Les plaquettes reconnaissent la présence de complexes immuns à la surface des vecteurs *via* leurs récepteurs Fc. L'existence de plaquettes agrégées stimule la production des facteurs C3a et C5a du complément, ce qui peut jouer un rôle dans la survenue de réactions d'hypersensibilité. Ces réactions d'hypersensibilité apparaissent plus fréquemment qu'avec le principe actif seul (Jiskoot *et al.*, 2009). Les liposomes cationiques peuvent activer le complément par la voie alterne. Certaines têtes polaires, l'existence de charges ou de cholestérol, une polydispersité et de larges diamètres sont autant de facteurs potentiellement responsables de l'activation du complément (Jiskoot *et al.*, 2009). Parfois, l'emploi de PEG avec des formulations liposomales d'acides nucléiques peut *a contrario* les rendre plus immunogéniques et donc plus vite éliminées de la circulation sanguine (Semple *et al.*, 2005) ; des anticorps anti PEG ont même été décrits (Armstrong *et al.*, 2007).

L'impossibilité d'utilisation du PEG oblige à trouver d'autres moyens de stabilisation stérique des vecteurs. C'est pourquoi certains auteurs ont développés d'autres approches comme l'association des lipoplexes avec la transferrine (Simoes *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2009). En plus d'un apport de furtivité, cela peut apporter des capacités de ciblage (Zenke *et al.*, 1990). Une autre alternative au PEG a été proposée avec l'emploi d'HA (*hyaluronic acid*) de haut poids moléculaire sur des liposomes non chargés (Peer *et al.*, 2004; Peer *et al.*, 2004). Cette stratégie permet de répondre aux exigences de furtivité, de non agrégation et de charge globale non positive tout en respectant une certaine bioinertie, quoiqu'elle soit encore controversée. En considérant qu'un excès de charges positives est un facteur de cytotoxicité,

comme dans le cas du PEI (Yao *et al.*, 2010), et en pensant que le PEG « anionisé » était plus performant que le PEG classique (Nicolazzi *et al.*, 2003), les charges négatives de l'HA sont très probablement un point fort supplémentaire.

c) Ciblage actif des tumeurs : vecteurs de « troisième génération »

Une fois arrivé au niveau du tissu ciblé, le vecteur ne devra entrer en contact qu'avec la cellule ciblée de façon à réduire sa toxicité sur des cellules adjacentes non tumorales, ce qui permet d'optimiser la dose délivrée. La tumeur exprime à sa surface de nombreux récepteurs spécifiques qui lui sont indispensables pour sa progression. Ce sont ces récepteurs qui vont être exploités afin de cibler spécifiquement un agent thérapeutique au sein du foyer tumoral (Jaracz *et al.*, 2005). Pour réussir efficacement et spécifiquement la délivrance d'un agent thérapeutique, il est important de discriminer les différences physiologiques et morphologiques entre les cellules saines et les cellules tumorales.

Les vecteurs dits de troisième génération offrent la possibilité d'un ciblage actif sélectif *via* un élément greffé au vecteur reconnaissant spécifiquement un élément caractéristique de la cellule pathologique. Cette reconnaissance tumorale ciblée permet une plus forte internalisation et ainsi une meilleure efficacité de transfection, tout en permettant d'obtenir une innocuité vis à vis d'autres tissus. Après reconnaissance des récepteurs membranaires, grâce à des molécules d'adressage, une endocytose sélective des vecteurs est possible. L'emploi de molécule d'adressage est basé sur l'hypothèse que le vecteur « étiqueté » par cette molécule va être endocyté par la même voie que la molécule d'adressage seule (Hillaireau *et al.*, 2009).

Différentes molécules d'adressage ont pu être utilisées pour la formulation de vecteurs de troisième génération. Elles sont listées ici de façon non exhaustive :

- le folate, indispensable aux cellules en division puisqu'il est un cofacteur essentiel à la synthèse des bases azotées de l'ADN, peut être greffé à la surface des liposomes de façon à cibler les cellules tumorales surexprimant le récepteur du folate (FR) par rapport aux tissus normaux (Stephenson *et al.*, 2004),
- le galactose peut être utilisé de façon à cibler des hépatocytes comme montré avec les cellules Hep-G2, surexprimant le récepteur de l'asialoglycoprotéine (Managit *et al.*, 2005),

- la neurotensine, peptide composé de 13 acides aminés permet de cibler son récepteur (NTR) (Martinez-Fong *et al.*, 1999) surexprimé à la surface des cellules d'adénocarcinomes du colon (NTR3) (Haase *et al.*, 2006) et du cancer du sein (NT1R) (Souaze *et al.*, 2006),
- le RGD, peptide composé de 3 acides aminés, Arginine-Glycine-Aspartate montre une forte affinité et sélectivité pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (Garanger *et al.*, 2007) présentes principalement au niveau des cellules du cancer de l'ovaire,
- la transferrine, protéine plasmatique de transport du fer, permet de se lier spécifiquement au récepteur membranaire de la transferrine, surexprimé dans les tumeurs solides (en raison d'un besoin élevé en fer des cellules en division), et favorisant leur endocytose (Ishida *et al.*, 2001),
- anticorps : l'emploi de fragments d'anticorps scFv plutôt que l'anticorps entier permet de minimiser les phénomènes d'immunotoxicité et d'améliorer la pénétration dans les tumeurs solides. C'est ainsi que Xu *et al.* ont utilisé *in vivo* un fragment scFv ciblant les tumeurs ayant le récepteur à la transferrine (Xu *et al.*, 2002). Par ailleurs, Park *et al.* ont fixé des fragments d'anticorps monoclonaux reconnaissant le récepteur membranaire HER-2, appartenant à la famille de l'EGF-R, qui est surexprimé dans les tumeurs mammaires (Park *et al.*, 2001).

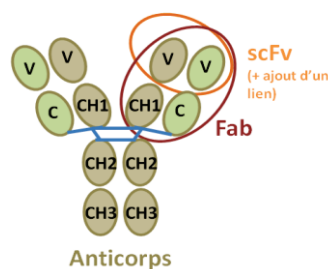


Figure 18 : Présentation des fragments Fab et scFv sur un anticorps entier.

2. Mécanismes d'internalisation cellulaire des vecteurs

Les mécanismes dirigeant l'internalisation des vecteurs peuvent être divisés en deux groupes : la phagocytose et les autres voies d'endocytose (souvent regroupées sous le terme « pinocytose ») (Hillaireau *et al.*, 2009; Iversen *et al.*, 2011). La phagocytose est employée surtout par les cellules dites phagocytes, c'est à dire les macrophages et autres monocytes. Mais des cellules telles que les fibroblastes, et les cellules endothéliales et épithéliales sont capables également de phagocyter dans une moindre mesure.

Parmi les voies d'endocytose, on distingue : (1). l'endocytose dépendante des clathrines (nécessitant l'intervention d'enveloppe de clathrine), (2). l'endocytose médiée par les cavéoles (faisant intervenir les cavéolines), (3). la macropinocytose et (4). l'endocytose indépendante des clathrines et des cavéoles (Hillaireau *et al.*, 2009; Sahay *et al.*, 2010).

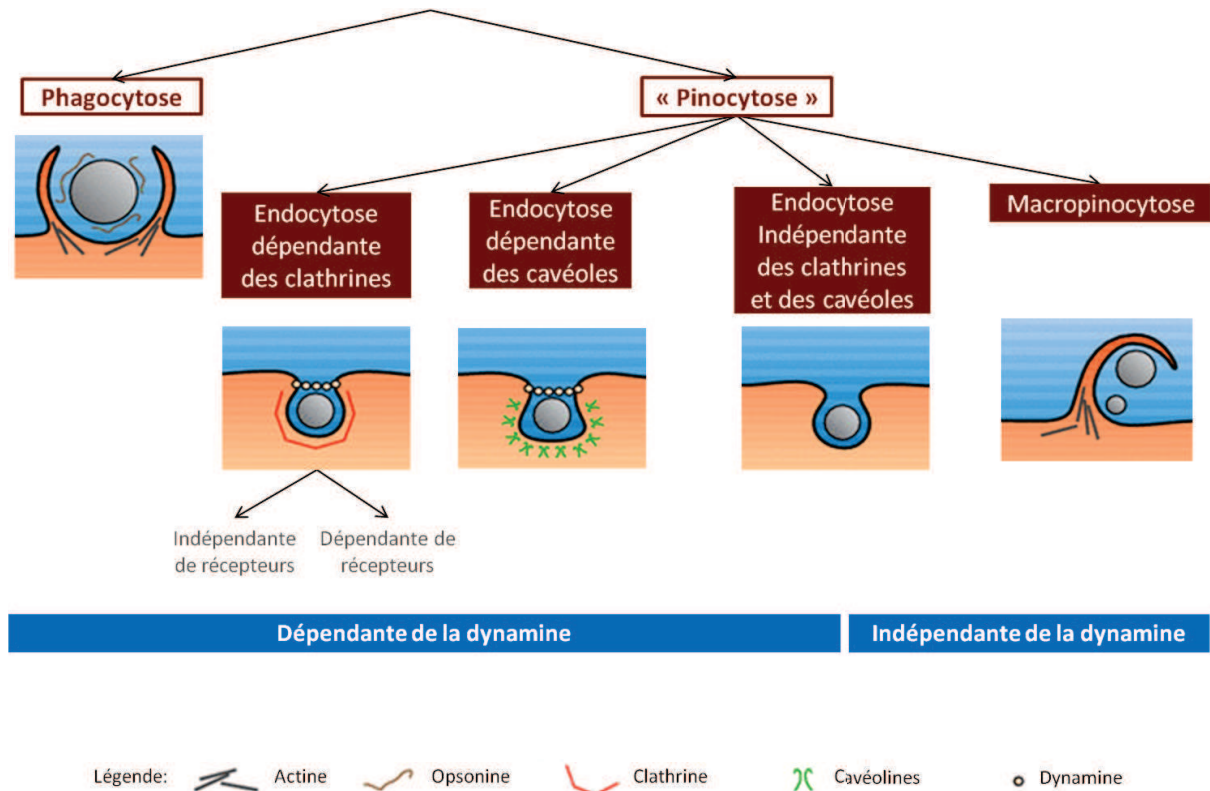


Figure 19 : Classifications des mécanismes d'endocytose à partir des revues suivantes (Hillaireau *et al.*, 2009; Sahay *et al.*, 2010; Iversen *et al.*, 2011).

Le trafic intracellulaire des lipoplexes dépend fortement de leur composition, de leur diamètre, de leur morphologie et de leurs caractéristiques de surface. Par exemple, les lipoplexes à base de DOTAP empruntent la voie d'endocytose dépendante des clathrines, tandis que ceux comportant du DMRIE passent par les cavéoles (Sahay *et al.*, 2010).

Pour les agents transportant de l'ADN, il y a formation d'une vésicule d'endocytose pour leur internalisation, quelle que soit la voie empruntée y compris pour les cavéoles (Sahay *et al.*, 2010; Ziello *et al.*, 2010). Cette vésicule forme alors un endosome précoce où la cellule trie et oriente vers un recyclage ou vers la dégradation les éléments internalisés. Cet endosome précoce donne ensuite un endosome tardif au pH plus acide et aux enzymes de dégradation

nombreuses, qui va fusionner avec les lysosomes où les enzymes sont encore plus concentrées (Ziello *et al.*, 2010).

Les méthodes d'étude des voies d'endocytose impliquées dans l'internalisation des vecteurs reposent sur deux aspects (Sahay *et al.*, 2010). Premièrement, la colocalisation des vecteurs avec des marqueurs ou des structures spécifiques peut être recherchée. En revanche, le peu de sélectivité et surtout, la variation de la voie empruntée par un même marqueur en fonction du type cellulaire, sont des inconvénients limitants.

Deuxièmement, l'exclusion de mécanismes d'endocytose repose d'une part sur l'emploi d'inhibiteurs pharmacologiques de l'endocytose (chlorpromazine, filipine, génistéine...). Ceux-ci sont à coupler entre eux de façon à mieux discriminer les voies empruntées (Ivanov 2008; Iversen *et al.*, 2011). En effet, l'analyse est compliquée par le fait que la majorité des vecteurs empruntent plus d'une voie d'endocytose et qu'aucun inhibiteur n'est parfaitement spécifique d'une voie (Sahay *et al.*, 2010). D'autre part ces études menées sur des cellules dont les protéines spécifiques d'une voie d'endocytose ont été préalablement mutées ou inhibées par l'emploi de siRNA (Iversen *et al.*, 2011).

3. Devenir subcellulaire

Après internalisation par endocytose, le plasmide doit pour être actif, être libéré dans le cytoplasme, puis atteindre le noyau. Afin que la libération de l'endosome vers le cytoplasme soit effective et évite la dégradation lysosomale, trois possibilités sont envisageables : premièrement, l'utilisation d'un lipide cationique permettant une délivrance cytoplasmique aisée en déstructurant la bicouche de l'endosome. La bicouche de lipides cationiques interagit avec la membrane de l'endosome par phénomène de flip flop membranaire (Xu *et al.*, 1996). Deuxièmement, l'utilisation de lipides pH sensibles comme la DOPE libèrent l'ADN dans le cytoplasme en passant d'une phase lamellaire à une phase hexagonale au contact du pH acide de l'endosome tout en interagissant avec les phospholipides membranaires de ce dernier. Et troisièmement, l'emploi de groupements qui imitent les mécanismes utilisés par les virus pour échapper à l'endosome comme le peptide fusogénique GALA ou la protéine F du virus de Sendai, qui provoquent la lyse de l'endosome (pour revue (Cho *et al.*, 2003)).

Mais il apparaît que les lipoplexes sont 3 à 150 fois (écart lié aux types de lignées cellulaires testées et aux conditions de transfection) plus efficaces que les liposomes pH sensibles pour transférer l'ADN dans les cellules. En effet, les lipides cationiques permettent une liaison

beaucoup plus forte à la membrane cellulaire, avec une pénétration plus rapide permettant de délivrer huit fois plus d'ADN (Legendre *et al.*, 1992). Au sein de formulations de lipoplexes, puisque les lipides cationiques sont le plus souvent associés à la DOPE, la sortie de l'endosome doit pouvoir s'effectuer par les deux dernières possibilités présentées.

Après libération dans le cytoplasme, le plasmide doit atteindre le noyau. Bien que délicat à contrôler, l'importation nucléaire du plasmide peut être favorisée par la présence de différentes séquences dont les NLSs (*nuclear localization signals*) qui sont de courts peptides interagissant avec les importines capables de faire entrer l'ADN *via* le pore nucléaire (Gorlich *et al.*, 1999). Néanmoins, lorsque l'on est face à des cellules en division, la migration dans le noyau est facilitée par disparition de la membrane nucléaire en prophase de la mitose (Nakamura *et al.*, 2006).

IV. Lipoplexes d'acide hyaluronique ciblant CD44, récepteur clé du développement tumoral

A. CD44, un récepteur de choix pour cibler les cellules souches cancéreuses

La définition d'une stratégie de vectorisation performante s'établit, entre autre, sur l'existence de récepteurs à la surface de cellules incontournables au développement de la pathologie. Cibler ces récepteurs permet d'aborder ces dernières de façon privilégiée par rapport aux cellules adjacentes. C'est précisément ce qui fait ressortir l'intérêt de cibler le récepteur membranaire CD44 (*cluster of differentiation 44*) exprimé par les cellules souches cancéreuses (CSC), cellules clé dans le développement des cancers, pour atteindre aussi bien la tumeur primaire, que prévenir ou traiter les métastases. En effet, selon la théorie des CSC, le ciblage de ces dernières entraînerait potentiellement la dégénérescence de la tumeur primaire (Reya *et al.*, 2001) et préviendrait de l'apparition de métastases.

1. Rôles physiologiques et pathologiques

CD44 appartient à la famille des molécules d'adhésion cellulaire (CAM pour *cell adhesion molecule*) tout comme les intégrines, les sélectines et les cadhérines. Les CAM contrôlent le comportement cellulaire en organisant les contacts entre cellules, ainsi qu'entre la matrice extracellulaire et les cellules. Elles sont primordiales au maintien de l'intégrité tissulaire : CD44 régule la croissance, la survie, la différenciation et la migration cellulaire. Sous dérèglement pathologique, CD44 est impliqué dans la progression tumorale et le processus métastatique (Orian-Rousseau 2010).

2. Diversité structurale et fonctionnelle

CD44 est une glycoprotéine transmembranaire de classe I, codée par un seul gène présent sur le chromosome 11 et composé de 20 exons dont les 10 centraux sont régulés par épissages alternatifs et responsables de l'existence d'isoformes variantes (Ponta *et al.*, 2003). Les formes variantes CD44v, contrairement à la forme standard CD44s (autrement appelé CD44H), confèrent des propriétés métastatiques aux cellules (Visvader *et al.*, 2008).

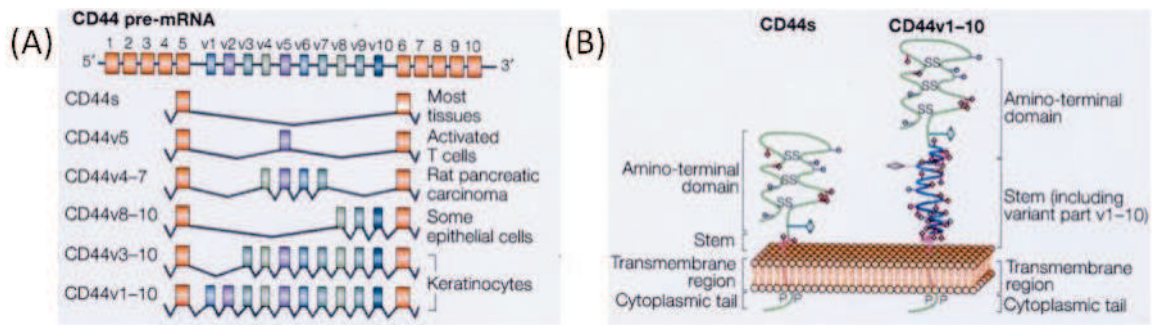


Figure 20 : (A) Représentation des 20 exons de l'ARNm de CD44 dont 10 peuvent subir un épissage alternatif, et (B) comparaison de la structure protéique de CD44s avec les variants de CD44 (Ponta *et al.*, 2003).

CD44 présente donc une diversité structurale et fonctionnelle provenant des épissages alternatifs du pré-ARNm transcrit à partir du gène de CD44, mais aussi due à diverses N- et O-glycosylations post-traductionnelles (certains exemples sont présentés ci-dessous) amenant à des variations de poids moléculaire de 80 à 200 kDa. Le domaine transmembranaire ancre CD44 dans les *rafts* lipidiques (Ponta *et al.*, 2003).

3. Partenaires extracellulaires et intracellulaires

a) Communications avec le milieu extracellulaire

Les cinq premiers exons non variables codent pour la partie N-terminale du domaine extracellulaire de CD44 responsable de la liaison à son ligand principal, l'acide hyaluronique (Ponta *et al.*, 2003), ou avec d'autres partenaires tels que l'ostéopontine (cytokine contribuant au processus métastatique dans de nombreux cancers), le collagène, la fibronectine, le fibrinogène, la laminine, la chondroïtine sulfate, etc (Orian-Rousseau 2010).

L'effet des différents états de glycosylation du domaine extracellulaire sur l'affinité HA-CD44 est assez flou et diffère selon la technique employée. Avec l'électrophorèse capillaire, l'affinité de liaison de l'HA à CD44 :

- diminue lorsqu'il y a une α 2,3 sialylation N terminale,
- augmente lorsque le premier résidu est de la N-acétylglucosamine ou lorsqu'il y a des O-glycosylations sur une protéine CD44 sans résidus N-glycosylés.

Cette affinité de liaison dépend de la force d'interaction et de la stabilité de la liaison ligand-récepteur ($K_d = 5$ à >150 μ M en fonction des différents états de glycosylation). L'avidité (effet résultant de la somme de plusieurs affinités) de la liaison HA-CD44 augmente en cas

d'incorporation de N-acétylgalactosamine au sein de glycanes non N-glycosylés, (Skelton *et al.*, 1998).

De plus, CD44 est capable de collaborer avec des récepteurs tyrosine kinase : l'isoforme CD44-v6 (dans les cancers pancréatiques notamment) est capable d'interagir avec VEGFR-2, un acteur prédominant de l'angiogénèse, ou même jouer le rôle de co-récepteur pour c-Met qui est capable de conférer un potentiel métastatique (Orian-Rousseau 2010).

b) Communications avec le milieu intracellulaire

La partie cytoplasmique de CD44 se lie à l'ankyrine (elle même en contact avec la spectrine) et aux protéines ERM (ezrin, radixin, moesin) (communicantes avec la F-actine), ce qui permet d'établir un lien avec les éléments du cytosquelette (Ponta *et al.*, 2003; Orian-Rousseau 2010). L'interaction avec l'ankyrine explique en partie les effets de CD44 sur la motilité et l'adhésion cellulaire ; celle avec ERM joue un rôle dans la régulation de la migration cellulaire.

Par ailleurs, la protéine Merlin (*moesin-ezrin-radixin-like*), suppresseur de tumeur, et rattachée à la famille ERM, se lie à CD44 sur le même motif de la partie cytoplasmique de ERM. Les effets de ERM et de Merlin sont cependant opposés : l'activation des protéines ERM et l'inactivation de la protéine Merlin, par phosphorylation, activent la voie des MAP Kinases par l'activation de Ras puis de la cascade de phosphorylation Raf/MEK/ERK ce qui conduit à la prolifération cellulaire. A l'inverse, la déphosphorylation de Merlin et de ERM, liée à une densité cellulaire importante (Morrison *et al.*, 2001) ou à une accumulation d'HA de haut poids moléculaire dans le milieu extracellulaire, inhibe cette cascade et contrecarre la croissance des cellules (Ponta *et al.*, 2003).

4. Implication de CD44 dans les cellules souches cancéreuses

CD44 est un des marqueurs à la surface des CSC qui dirigent certains cancers, notamment celui du sein (Al-Hajj *et al.*, 2003; Ricardo *et al.*, 2011). Dans des modèles de xénogreffes de cellules de cancer du sein MCF-7 et T47D, l'échappement au traitement conduit à la dissémination métastatique et à l'infiltration des nodules lymphatiques par des cellules tumorales exprimant le récepteur membranaire CD44 (Harrell *et al.*, 2006). CD44 est également exprimé par les CSC du pancréas (Li *et al.*, 2007), du foie (Yang *et al.*, 2008), de la

vessie (Chan *et al.*, 2009), du colon, de la tête et du cou (Visvader *et al.*, 2008), et de la prostate (Collins *et al.*, 2005).

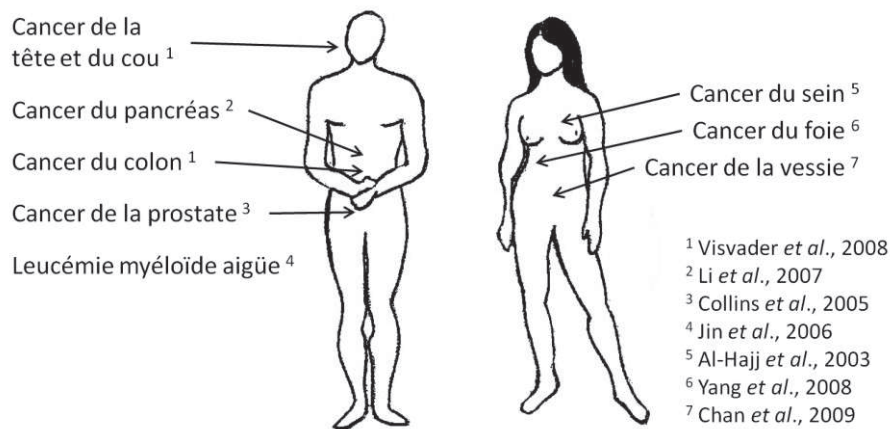


Figure 21 : Cancers dont les CSC expriment CD44.

Ainsi il est stratégique d'envisager un ciblage de cellules exprimant CD44, c'est-à-dire celles-là mêmes qui sont les chefs d'orchestre de ces cancers. En conclusion, une telle approche permettrait de cibler les CSC de la tumeur primaire, réprimer l'apparition de métastases et traiter les métastases existantes.

B. Utilisation de l'acide hyaluronique pour le ciblage de CD44

1. Généralités sur l'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (HA), de nature ubiquitaire, est le constituant majeur de la matrice extracellulaire. L'HA est un glycosaminoglycane non estérifié composé d'unités disaccharidiques de N-acétylglucosamine et d'acide glucuronique enchaînées alternativement en $\beta 1 \rightarrow 4$ et $\beta 1 \rightarrow 3$ (Figure 22).

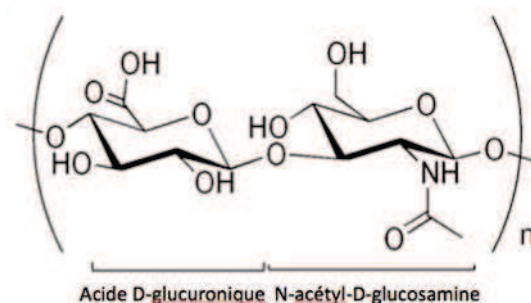


Figure 22 : Structure de l'acide hyaluronique. La chaîne d'HA contient jusqu'à 25000 répétitions de l'unité disaccharidique composé de N-acétyl-D-glucosamine et d'acide D-glucuronique lié entre eux par l'alternance de liaisons glycosidiques $\beta 1 \rightarrow 3$ et $\beta 1 \rightarrow 4$. Chaque unité dissaccharidique a un groupement carboxylique, quatre groupements hydroxyle et un groupement acétamide. A pH physiologique, la molécule est ionisée au niveau du groupement carboxylique de l'acide glucuronique (Pardue *et al.*, 2008).

Il est obtenu par amplification et purification bactérienne. L'HA peut se lier à plusieurs récepteurs : CD44, RHAMM (*Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility*), ICAM-1 (*IntraCellular Adhesion Molecule-1*), TLR-4 (*Toll-Like-Receptor-4*), *Hepatic HA clearance receptor*, LYVE-1 (*LYmphatic Vessel Endocytic receptor*) (Pardue *et al.*, 2008). Son principal récepteur est CD44.

2. Interactions avec CD44 : importance du poids moléculaire

L'HA possède à la fois un rôle structural au sein de la matrice extracellulaire, et un rôle transducteur de signaux intracellulaires *via* sa liaison à son récepteur transmembranaire spécifique CD44.

a) Affinité

Le domaine spécifique de liaison de CD44 à l'HA comporte 160 résidus acides aminés. L'affinité de liaison HA-CD44 est dépendante de la taille du polysaccharide. Les hexamères et décimères d'HA sont considérés comme les plus petites tailles d'HA pouvant se lier à CD44. Les oligomères plus grands (supérieurs à 20) sont plus affins car ils ont la possibilité de se lier à plusieurs CD44 en même temps (Jaracz *et al.*, 2005).

b) Activation des différentes voies de signalisation en fonction du poids moléculaire

Sous des conditions homéostatiques, l'HA existe sous forme de haut poids moléculaire et joue un rôle primordial dans l'intégrité structurale des tissus (Noble 2002). Sous conditions de stress (telles que les cancers), des fragments de plus bas poids moléculaires sont produits modifiant du même coup les propriétés biologiques de l'HA (Noble 2002). Ainsi, la présence de CD44 est corrélée à la présence d'HA et d'héparanase (enzyme dégradant les héparanes sulfates). Ce trio génère un micro-environnement favorable à la prolifération, la migration, l'invasion métastatique, et l'adhésion des cellules tumorales, ainsi qu'à l'angiogénèse (Ponta *et al.*, 2003; Gotte *et al.*, 2006). L'HA en interagissant avec CD44 induit des voies de signalisation impliquées dans la croissance des cellules tumorales, la survie et la migration, augmentant ainsi la dispersion des métastases (Toole 2004; Tzircotis *et al.*, 2005; Marangoni *et al.*, 2009). Lorsque des fragments d'HA de 2 à 100 kDa (soit environ 4 à 250 unités disaccharidiques d'HA) se lient à CD44, il y a un effet angiogénique *in vitro*, contribuant à favoriser la croissance tumorale (Stern 2003). Dès 1985, des expériences sur membranes

chorioallantoïques d'embryons de poulet ont montré que seuls les fragments d'HA de 2 à 10 kDa (soit 4 à 25 disaccharides) forment de nouveaux vaisseaux (West *et al.*, 1985). Contrairement aux fragments d'HA, l'HA natif de haut poids moléculaire (de 3000 à 6000 kDa) n'induit pas l'expression de gènes impliqués dans la prolifération ou l'inflammation (Noble 2002) et antagonise les effets proangiogéniques dûs aux fragments d'HA (Deed *et al.*, 1997). Tout ceci amène à pouvoir considérer l'HA de haut poids moléculaire comme étant biocompatible, voire « bioinerte » (Pardue *et al.*, 2008).

Plus généralement, la caractéristique fondamentale à considérer lors de l'élaboration d'un système galénique est le respect du rapport bénéfice/risque : l'action anticancéreuse de l'agent vectorisé doit être prépondérante en termes d'effets ou en termes de délais d'action sur les conséquences d'un éventuel déclenchement de voies de signalisation protumorales.

3. Intérêts de l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire dans la formulation de liposomes et lipoplexes

a) Alternative à l'utilisation d'un anticorps

Si l'utilisation d'une molécule ciblant un récepteur particulièrement surexprimé à l'état pathologique est un atout pour la réussite d'un ciblage, il ne faut pas négliger le risque d'activations de voies de signalisation particulièrement intéressantes pour la cellule cancéreuse, qui sont généralement impliquées dans le processus tumorigénique (prolifération cellulaire, dissémination, invasion). En effet, si ce récepteur s'exprime dans ce cadre pathologique, c'est soulignons-le, par utilité pour la cellule cancéreuse. On peut y voir là, un intérêt à utiliser en vectorisation des anticorps qui inactivent les voies de signalisation modulées par le récepteur reconnu afin de pouvoir créer un double effet d'apport de molécule thérapeutique d'une part, et de condamnation de voies de signalisation procancéreuses d'autre part. L'utilisation d'un anticorps confère une plus grande spécificité de reconnaissance et sa liaison au site extracellulaire d'un récepteur membranaire n'empêche pas l'endocytose (Park *et al.*, 2002). En revanche, il faut premièrement que les régions du récepteur bloqué par l'anticorps soient identiques à celles de la molécule agoniste afin de réellement empêcher le déclenchement de la cascade de signalisation. Deuxièmement, des administrations répétées de liposomes comportant des anticorps même humanisés, ou des fragments d'anticorps, peuvent entraîner un risque d'immunotoxicité. Et troisièmement, la formulation de tels systèmes est plus coûteuses et plus exigeantes (par obligation de maintien de la structure protéique de l'anticorps pour garantir son activité).

Ceci étant, des formulations d'immunolipoplexes ont vu le jour, comme des immunolipoplexes pégylés (PEG 3400-DOPE) contenant des fragments Fab anti-HER2 pour cibler des cellules de cancer du sein *in vitro* (Lee *et al.*, 2003), ou encore des immunolipoplexes pégylés (PEG 2000) contenant des fragments Fab de récepteur de glycoprotéines associées au tumeur de cancer de colon testés *in vitro* et *in vivo*. Ces derniers, après administration intraveineuse, conduisent à une inhibition de la croissance tumorale, ainsi qu'à une diminution de l'angiogénèse, uniquement en présence du fragment Fab dans la formulation vectorisant des gènes à potentialités thérapeutiques (Kim *et al.*, 2008). Des immunolipoplexes ont été développés à partir d'une formulation DOTAP:DOPE (1:1) et de fragments scFv du récepteur de la transferrine (TfRscFv). Aucune toxicité apparente n'a été relevée lors d'administrations intraveineuses bihebdomadaires chez la souris comportant un modèle de xénogreffe sous cutané (Xu *et al.*, 2001). Mais la formulation nécessite des améliorations car elle présente une clairance rapide. Pour remédier à ce problème, la même équipe a ajouté du PEG (3400) (Yu *et al.*, 2004) : on voit ici que l'ajout d'un ligand peut permettre de surpasser les incompatibilités PEG/lipoplexes.

b) Affinité des formulations d'acide hyaluronique pour CD44

Plusieurs formulations utilisant des HA de différentes longueurs, sont retrouvées dans la littérature (figure 22). Par exemple, Eliaz emploie des liposomes contenant de la phosphatidyléthanolamine greffée à des hexamères de HA (soit un peu plus de 2 kDa) obtenus après hydrolyse (Eliaz *et al.*, 2001). L'utilisation d'hexamères de HA confère une faible affinité à CD44 et privilégie ainsi leur liaison à des cellules exprimant très fortement CD44. Ce mécanisme basé sur le différentiel d'expression du récepteur permet d'augmenter la sélectivité aux cellules tumorales. Une équipe a évalué des liposomes cationiques, à base de DC6-14 (chlorure de O,O'-ditétradécanoyl-N-(alpha-triméthylammonium-acétyl)diéthanolamine), de lipide DOPE et de cholestérol, contenant un conjugué d'HA de poids moléculaire de 500 à 700 kDa et de stéarylamine, afin de cibler les cellules endothéliales du foie *in vivo*. Les profils de pharmacocinétique et de biodistribution diffèrent entre l'utilisation d'« HA stéarylé » et d'HA libre (Toriyabe *et al.*, 2011).

L'impact de l'emploi de différents poids moléculaire d'HA de 5-8, 10-12, à 175-350 kDa conjugué à du PE sur l'endocytose de liposomes de PC:PE:Chol a été étudié dans des cellules exprimant CD44 : MDA-MB231 (cancer du sein) et A549 (cancer du poumon). La capture cellulaire augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire de l'HA, de la quantité d'HA greffée et du taux d'expression cellulaire de CD44 (Qhattal *et al.*, 2011).

Types de formulation	Types d'HA	Modes de préparation	Principales conclusions	Modes d'évaluation	Références
liposomes PC:Chol:PE-HA 60:40:3	2 kDa	HA conjugué au PE par réaction d'amination en présence de cyanoborohydrate de sodium	Faible affinité pour CD44 permettant une sélection des cellules le surexprimant	<i>in vitro</i> : B16F10 (mélanome murin), CV-1 (rein de singe)	Eliaz <i>et al.</i> , 2001
liposomes DC6-14:DOPE:Chol 40:30:30	500 à 700 kDa	HA conjugué à la stéarylamine par réaction d'amination en solvant organique par EDC/NHS en DMF/chloroforme	Modification des profils de pharmacocinétiques et de biodistribution grâce à l'utilisation d'un conjugué	<i>in vivo</i> : souris sans tumeurs	Toriyabe <i>et al.</i> , 2011
liposomes PC:PE:Chol 65:5:30	5-8, 10-12, 175-350 kDa	HA conjugué par la méthode de Yérushalmi <i>et al.</i> , 1998 sur du PE (Quattal <i>et al.</i> , 2011), ou sur les liposomes: réaction d'amination en milieu aqueux par EDC puis en tampon borate	La capture cellulaire augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire de l'HA, de la quantité d'HA, et de la densité de CD44 cellulaire	<i>in vitro</i> : MDA-MB231 (cancer sein) et A549 (cancer poumon)	Qhattal <i>et al.</i> , 2011
liposomes PC:PE:Chol 3:1:1	~1000 kDa		1. Augmentation de la quantité de principes actifs dans la tumeur; 2. Augmentation du temps de demi-vie plasmatique; 3. Pas d'activation néfaste de CD44, mais bonne reconnaissance des cellules cibles	<i>in vivo</i> : souris avec tumeurs murines ou xénotreffes humaines	Peer <i>et al.</i> , Int J Cancer, 2004; Peer <i>et al.</i> , Neoplasia, 2004
liposomes PC:Chol:DPPE 15:4:1	6,4, 31, 132, 700, 1500 kDa		Pas d'activation des macrophages, ni de la fraction C5b du complément, ni du complexe d'attaque membranaire, pas d'induction de cytokines	<i>in vitro</i> : NCI/ADR-RES (cancer ovaire), RAW 264,7 (macrophages murins), TK-1 (lymphomes murins)	Mizrahy <i>et al.</i> , 2011

Figure 23 : Tableau récapitulatif des études relatives à l'emploi d'HA conjugués à des formulations de liposomes dans le but de cibler CD44 ou d'offrir une alternative au PEG. Abréviations : PE phosphatidyléthanolamine, PC phosphatidylcholine, Chol cholestérol, DC6-14 chlorure de O,O'-ditétradécanoyl-N-(alpha-triméthylammonium-acétyl)diéthanolamine, DPPE 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine, EDC éthyl-diméthyl aminopropyl carbodiimide, NHS N-hydroxysuccinimide, DMF diméthylformamide.

c) Alternative au PEG (Cf. III.C.1.b))

Peer *et al.*, ont testé l'emploi d'HA de haut poids moléculaire (~1000 kDa) pour répondre à un double objectif de ciblage et de blocage du phénomène d'opsonisation (Peer *et al.*, 2004; Peer *et al.*, 2004). En effet, la présence de groupements hydroxyles sur l'HA confère un « manteau » hydrophile au vecteur (au même titre que des molécules de PEG). La furtivité est alors combinée au ciblage cellulaire. L'HA est directement lié aux liposomes (Yerushalmi *et al.*, 1998). Les liposomes d'HA permettent d'apporter des quantités de principes actifs 4 (Peer *et al.*, 2004) à 7 (Peer *et al.*, 2004) fois plus importantes au niveau de la tumeur que les liposomes sans HA, et 30 fois plus que les principes actifs non formulés. L'utilisation d'HA de haut poids moléculaire permet bien une prolongation du temps de circulation du vecteur (avec un temps de demi vie légèrement inférieur à des liposomes PEGylés), et semble bloquer CD44 et ainsi prévenir les effets néfastes tout en permettant une reconnaissance correcte de la

cible (Peer *et al.*, 2004). Cette caractéristique de l'HA constitue un outil moléculaire intéressant pour la vectorisation des lipoplexes.

Dans une autre étude, des liposomes unilamellaires de phosphatidylcholine, cholestérol et DPPE (1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine) comportant de l'HA de 6,4 kDa à 1500 kDa n'ont montré aucune activation ni des macrophages, ni de la fraction C5b et du complexe d'attaque membranaire appartenant au système du complément. De plus, aucune induction de cytokines n'a été observée. Les auteurs proposent sur la base que l'affinité des liposomes HA pour CD44 augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire de l'HA, que les bas poids moléculaires (6,4 kDa) puissent servir d'alternative au PEG en termes de stabilisation stérique, tandis que les haut poids moléculaire (1500 kDa) permettraient en plus un ciblage spécifique de CD44 (Mizrahy *et al.*, 2011).

V. Conclusions

La thérapie génique consiste à employer l'ADN en tant qu'agent thérapeutique afin d'agir à la source d'une pathologie. La dégradabilité en systémique de l'ADN, ainsi que sa taille importante sont des paramètres limitants son utilisation. Sa complexation à des lipides cationiques organisés en liposomes, permet sa condensation et sa protection. L'emploi du lipide cationique DE, aux chaînes courtes saturées, associé au colipide DOPE, crée une formulation liposomale prometteuse.

Les lipoplexes de première génération, nous l'avons vu, nécessitent toutefois des améliorations afin :

- d'obtenir des vecteurs réadministrables car peu immunogènes,
- d'être les moins toxiques possibles,
- de retarder la clairance plasmatique,
- de ne pas subir d'agrégation,
- d'autoriser une extravasation tumorale par effet EPR,
- d'assurer un ciblage sélectif de la cellule visée,
- de permettre l'internalisation et la distribution subcellulaire de l'ADN plasmidique.

C'est pourquoi les lipoplexes doivent pouvoir 1/. adopter un caractère furtif afin d'éviter la baisse de biodisponibilité et d'éviter l'intolérance du vecteur et 2/. contenir des molécules d'adressage spécifique. L'impossibilité d'incorporation du PEG au sein d'une formulation de lipoplexes et l'intérêt d'une stratégie 2 en 1, répondant à l'apport de furtivité et de ciblage sélectif, ont fait ressortir l'atout de l'HA de haut poids moléculaire. En effet, d'après la théorie hiérarchisée, ce sont les CSC, au potentiel de prolifération indéfinie et aux mécanismes de régulation semblables à ceux des cellules souches normales, qui dictent la formation et la croissance tumorale ainsi que l'apparition des métastases dans certains cancers. L'expression de CD44 par certaines CSC offre la possibilité d'effectuer un ciblage stratégique. Par la formulation d'un lipoplexe à base de DE:DOPE comportant de l'HA de haut poids moléculaire, une thérapie génique stratégique est obtenue par voie intraveineuse. Par ailleurs, les intérêts thérapeutiques à établir une balance ER α /ER β en faveur de ER β , suppresseur de tumeur supposé, ont été présentés. Ainsi, notre stratégie de thérapie génique pourrait être envisagée comme un outil pour entreprendre le transfert du gène codant pour

ER β par voie intraveineuse, dans les cellules de tumeurs mammaires exprimant ER α et le récepteur membranaire CD44. Cela permettrait de contrecarrer les effets délétères de ER α et de bloquer le mécanisme de dissémination métastatique.

Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athelougou M and Brauch H (2005). "Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis." Clin Cancer Res **11**(3): 1154-1159.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-3988.

Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C and Yau-Young A (1991). "Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo." Biochim Biophys Acta **1066**(1): 29-36.

Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, Devesa SS and Brinton LA (2005). "Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997." Int J Epidemiol **34**(2): 405-412.

Anwer K, Meaney C, Kao G, Hussain N, Shelvin R, Earls RM, Leonard P, Quezada A, Rolland AP and Sullivan SM (2000). "Cationic lipid-based delivery system for systemic cancer gene therapy." Cancer Gene Ther **7**(8): 1156-1164.

Armstrong JK, Hempel G, Koling S, Chan LS, Fisher T, Meiselman HJ and Garratty G (2007). "Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients." Cancer **110**(1): 103-111.

Arpicco S, Canevari S, Ceruti M, Galmozzi E, Rocco F and Cattel L (2004). "Synthesis, characterization and transfection activity of new saturated and unsaturated cationic lipids." Farmaco **59**(11): 869-878.

Avery OT, Macleod CM and McCarty M (1944). "Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii." J Exp Med **79**(2): 137-158.

Bally MB, Harvie P, Wong FM, Kong S, Wasan EK and Reimer DL (1999). "Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers." Adv Drug Deliv Rev **38**(3): 291-315.

Beato M, Truss M and Chavez S (1996). "Control of transcription by steroid hormones." Ann N Y Acad Sci **784**: 93-123.

Blume G and Cevc G (1990). "Liposomes for the sustained drug release in vivo." Biochim Biophys Acta **1029**(1): 91-97.

Bonnet D and Dick JE (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-737.

Bosetti C, Bertuccio P, Levi F, Chatenoud L, Negri E and La Vecchia C (2011). "The decline in breast cancer mortality in Europe: An update (to 2009)." Breast.

Bossard N, Velten M, Remontet L, Belot A, Maarouf N, Bouvier AM, Guizard AV, Tretarre B, Launoy G, Colonna M, Danzon A, Molinie F, Troussard X, Bourdon-Raverdy N, Carli

PM, Jaffre A, Bessagnet C, Sauleau E, Schwartz C, Arveux P, Maynadie M, Grosclaude P, Esteve J and Faivre J (2007). "Survival of cancer patients in France: a population-based study from The Association of the French Cancer Registries (FRANCIM)." Eur J Cancer **43**(1): 149-160.

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B and Behr JP (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7297-7301.

Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV and Auricchio F (2001). "PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells." Embo J **20**(21): 6050-6059.

Chalbos D, Vignon F, Keydar I and Rochefort H (1982). "Estrogens stimulate cell proliferation and induce secretory proteins in a human breast cancer cell line (T47D)." J Clin Endocrinol Metab **55**(2): 276-283.

Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, Gill H, Presti J, Jr., Chang HY, van de Rijn M, Shortliffe L and Weissman IL (2009). "Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(33): 14016-14021.

Chang EC, Frasor J, Komm B and Katzenellenbogen BS (2006). "Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells." Endocrinology **147**(10): 4831-4842.

Cho YW, Kim JD and Park K (2003). "Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol." J Pharm Pharmacol **55**(6): 721-734.

Choosakoonkriang S, Lobo BA, Koe GS, Koe JG and Middaugh CR (2003). "Biophysical characterization of PEI/DNA complexes." J Pharm Sci **92**(8): 1710-1722.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ and Maitland NJ (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." Cancer Res **65**(23): 10946-10951.

Cowley SM, Hoare S, Mosselman S and Parker MG (1997). "Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA." J Biol Chem **272**(32): 19858-19862.

Curley MD, Therrien VA, Cummings CL, Sergeant PA, Koulouris CR, Friel AM, Roberts DJ, Seiden MV, Scadden DT, Rueda BR and Foster R (2009). "CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer." Stem Cells **27**(12): 2875-2883.

Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG and Gustafsson JA (2006). "International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors." Pharmacol Rev **58**(4): 773-781.

De Rosa G, De Stefano D, Laguardia V, Arpicco S, Simeon V, Carnuccio R and Fattal E (2008). "Novel cationic liposome formulation for the delivery of an oligonucleotide decoy to NF-kappaB into activated macrophages." Eur J Pharm Biopharm **70**(1): 7-18.

- Deed R, Rooney P, Kumar P, Norton JD, Smith J, Freemont AJ and Kumar S (1997). "Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan." Int J Cancer **71**(2): 251-256.
- Dick JE (2003). "Breast cancer stem cells revealed." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3547-3549.
- Dickson RB, McManaway ME and Lippman ME (1986). "Estrogen-induced factors of breast cancer cells partially replace estrogen to promote tumor growth." Science **232**(4757): 1540-1543.
- Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB and Papahadjopoulos D (1999). "Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors." Pharmacol Rev **51**(4): 691-743.
- Eliasz RE and Szoka FC, Jr. (2001). "Liposome-encapsulated doxorubicin targeted to CD44: a strategy to kill CD44-overexpressing tumor cells." Cancer Res **61**(6): 2592-2601.
- Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M and Gustafsson JA (1997). "Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern." J Clin Endocrinol Metab **82**(12): 4258-4265.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M and Wehling M (2000). "Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects." Pharmacol Rev **52**(4): 513-556.
- Farhood H, Serbina N and Huang L (1995). "The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer." Biochim Biophys Acta **1235**(2): 289-295.
- Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M and Felgner PL (1994). "Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations." J Biol Chem **269**(4): 2550-2561.
- Felgner PL (1996). "Improvements in cationic liposomes for in vivo gene transfer." Hum Gene Ther **7**(15): 1791-1793.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM and Danielsen M (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7413-7417.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer **127**(12): 2893-2917.
- Fischer A, Hacein-Bey-Abina S and Cavazzana-Calvo M (2011). "Gene therapy for primary adaptive immune deficiencies." J Allergy Clin Immunol **127**(6): 1356-1359.
- Gabrilovich D (2004). "Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects." Nat Rev Immunol **4**(12): 941-952.

Gao X, Kim KS and Liu D (2007). "Nonviral gene delivery: what we know and what is next." AAPS J **9**(1): E92-104.

Garanger E, Boturyn D and Dumy P (2007). "Tumor targeting with RGD peptide ligands-design of new molecular conjugates for imaging and therapy of cancers." Anticancer Agents Med Chem **7**(5): 552-558.

Gershon H, Ghirlando R, Guttman SB and Minsky A (1993). "Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection." Biochemistry **32**(28): 7143-7151.

Gorlich D and Kutay U (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 607-660.

Gotte M and Yip GW (2006). "Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective." Cancer Res **66**(21): 10233-10237.

Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y and Shine J (1986). "Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA." Science **231**(4742): 1150-1154.

Gronemeyer H and Laudet V (1995). "Transcription factors 3: nuclear receptors." Protein Profile **2**(11): 1173-1308.

Haase C, Bergmann R, Oswald J, Zips D and Pietzsch J (2006). "Neurotensin receptors in adeno- and squamous cell carcinoma." Anticancer Res **26**(5A): 3527-3533.

Hall JM and McDonnell DP (1999). "The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens." Endocrinology **140**(12): 5566-5578.

Hall JM and McDonnell DP (2005). "Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting." Mol Interv **5**(6): 343-357.

Harrell JC, Dye WW, Allred DC, Jedlicka P, Spoelstra NS, Sartorius CA and Horwitz KB (2006). "Estrogen receptor positive breast cancer metastasis: altered hormonal sensitivity and tumor aggressiveness in lymphatic vessels and lymph nodes." Cancer Res **66**(18): 9308-9315.

Hartman J, Lindberg K, Morani A, Inzunza J, Strom A and Gustafsson JA (2006). "Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts." Cancer Res **66**(23): 11207-11213.

Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK and McDonald DM (2000). "Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness." Am J Pathol **156**(4): 1363-1380.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M and Gustafsson JA (2007). "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets." Physiol Rev **87**(3): 905-931.

Hillaireau H and Couvreur P (2009). "Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery." Cell Mol Life Sci **66**(17): 2873-2896.

Ishida O, Maruyama K, Tanahashi H, Iwatsuru M, Sasaki K, Eriguchi M and Yanagie H (2001). "Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo." Pharm Res **18**(7): 1042-1048.

Ivanov AI (2008). "Exocytosis and endocytosis. Preface." Methods Mol Biol **440**: v-vi.

Iversen TG, Skotland T and Sandvig K (2011). "Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies." Nano Today **6**(2): 176-185.

Jaracz S, Chen J, Kuznetsova LV and Ojima I (2005). "Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates." Bioorg Med Chem **13**(17): 5043-5054.

Jarraya B, Boulet S, Ralph GS, Jan C, Bonvento G, Azzouz M, Miskin JE, Shin M, Delzescaux T, Drouot X, Herard AS, Day DM, Brouillet E, Kingsman SM, Hantraye P, Mitrophanous KA, Mazarakis ND and Palfi S (2009). "Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia." Sci Transl Med **1**(2): 2ra4.

Jeong GJ, Byun HM, Kim JM, Yoon H, Choi HG, Kim WK, Kim SJ and Oh YK (2007). "Biodistribution and tissue expression kinetics of plasmid DNA complexed with polyethylenimines of different molecular weight and structure." J Control Release **118**(1): 118-125.

Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F and Dick JE (2006). "Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells." Nat Med **12**(10): 1167-1174.

Jiskoot W, van Schie RM, Carstens MG and Schellekens H (2009). "Immunological risk of injectable drug delivery systems." Pharm Res **26**(6): 1303-1314.

Johnson DG and Walker CL (1999). "Cyclins and cell cycle checkpoints." Annu Rev Pharmacol Toxicol **39**: 295-312.

Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT and Jacks T (2005). "Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer." Cell **121**(6): 823-835.

Kim KS, Lee YK, Kim JS, Koo KH, Hong HJ and Park YS (2008). "Targeted gene therapy of LS174 T human colon carcinoma by anti-TAG-72 immunoliposomes." Cancer Gene Ther **15**(5): 331-340.

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S and Gustafsson JA (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5925-5930.

Lasic DD (1997). Liposomes in gene delivery. Boca Raton, FL, CRC Press.

Lazennec G (2006). "Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis." Cancer Lett **231**(2): 151-157.

Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C and Vignon F (2001). "ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells." Endocrinology **142**(9): 4120-4130.

Lee CH, Hsiao M, Tseng YL and Chang FH (2003). "Enhanced gene delivery to HER-2-overexpressing breast cancer cells by modified immunolipoplexes conjugated with the anti-HER-2 antibody." J Biomed Sci **10**(3): 337-344.

Legendre JY and Szoka FC, Jr. (1992). "Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes." Pharm Res **9**(10): 1235-1242.

Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH and Murphy LC (1998). "Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis." Cancer Res **58**(15): 3197-3201.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF and Simeone DM (2007). "Identification of pancreatic cancer stem cells." Cancer Res **67**(3): 1030-1037.

Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J and Chang JC (2008). "Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy." J Natl Cancer Inst **100**(9): 672-679.

Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA and Ohlsson C (2003). "Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice." Mol Endocrinol **17**(2): 203-208.

Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH, Jr., Pestell RG and Kushner PJ (2002). "Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression." J Biol Chem **277**(27): 24353-24360.

Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, Hoey T, Sherlock G, Lewicki J, Shedden K and Clarke MF (2007). "The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells." N Engl J Med **356**(3): 217-226.

Lonard DM and O'Malley B W (2007). "Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation." Mol Cell **27**(5): 691-700.

Managit C, Kawakami S, Yamashita F and Hashida M (2005). "Effect of galactose density on asialoglycoprotein receptor-mediated uptake of galactosylated liposomes." J Pharm Sci **94**(10): 2266-2275.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P and Evans RM (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." Cell **83**(6): 835-839.

- Marangoni E, Lecomte N, Durand L, de Pinieux G, Decaudin D, Chomienne C, Smadja-Joffe F and Poupon MF (2009). "CD44 targeting reduces tumour growth and prevents post-chemotherapy relapse of human breast cancers xenografts." Br J Cancer **100**(6): 918-922.
- Martin B, Sainlos M, Aissaoui A, Oudrhiri N, Hauchecorne M, Vigneron JP, Lehn JM and Lehn P (2005). "The design of cationic lipids for gene delivery." Curr Pharm Des **11**(3): 375-394.
- Martinez-Fong D, Navarro-Quiroga I, Ochoa I, Alvarez-Maya I, Meraz MA, Luna J and Arias-Montano JA (1999). "Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells." Brain Res Mol Brain Res **69**(2): 249-262.
- McDonald DM and Choyke PL (2003). "Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic." Nat Med **9**(6): 713-725.
- Menasce LP, White GR, Harrison CJ and Boyle JM (1993). "Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique." Genomics **17**(1): 263-265.
- Merdan T, Kopecek J and Kissel T (2002). "Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer." Adv Drug Deliv Rev **54**(5): 715-758.
- Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M and Gannon F (2003). "Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter." Cell **115**(6): 751-763.
- Mizrahy S, Raz SR, Hasgaard M, Liu H, Soffer-Tsur N, Cohen K, Dvash R, Landsman-Milo D, Bremer MG, Moghimi SM and Peer D (2011). "Hyaluronan-coated nanoparticles: The influence of the molecular weight on CD44-hyaluronan interactions and on the immune response." J Control Release.
- Mocellin S, Rossi CR, Lise M and Nitti D (2004). "Colorectal cancer vaccines: principles, results, and perspectives." Gastroenterology **127**(6): 1821-1837.
- Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM and Willson TM (1998). "Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms." Biochem Biophys Res Commun **247**(1): 75-78.
- Morrison H, Sherman LS, Legg J, Banine F, Isacke C, Haipek CA, Gutmann DH, Ponta H and Herrlich P (2001). "The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44." Genes Dev **15**(8): 968-980.
- Mosselman S, Polman J and Dijkema R (1996). "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor." FEBS Lett **392**(1): 49-53.
- Murphy LC and Watson PH (2006). "Is oestrogen receptor-beta a predictor of endocrine therapy responsiveness in human breast cancer?" Endocr Relat Cancer **13**(2): 327-334.

Nakamura T, Moriguchi R, Kogure K, Minoura A, Masuda T, Akita H, Kato K, Hamada H, Ueno M, Futaki S and Harashima H (2006). "Delivery of condensed DNA by liposomal non-viral gene delivery system into nucleus of dendritic cells." Biol Pharm Bull **29**(6): 1290-1293.

New RRC (1990). Liposomes : a practical approach. Oxford, IRL ; IRL.

Nicolazzi C, Mignet N, de la Figuera N, Cadet M, Ibad RT, Seguin J, Scherman D and Bessodes M (2003). "Anionic polyethyleneglycol lipids added to cationic lipoplexes increase their plasmatic circulation time." J Control Release **88**(3): 429-443.

Noble PW (2002). "Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair." Matrix Biol **21**(1): 25-29.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S and Dick JE (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." Nature **445**(7123): 106-110.

O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK and Hansen U (2004). "Genomic targets of nuclear estrogen receptors." Mol Endocrinol **18**(8): 1859-1875.

Orian-Rousseau V (2010). "CD44, a therapeutic target for metastasising tumours." Eur J Cancer **46**(7): 1271-1277.

Oussoren C and Storm G (2001). "Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration." Adv Drug Deliv Rev **50**(1-2): 143-156.

Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Warri A, Weihua Z, Van Noorden S, Wahlstrom T, Coombes RC, Warner M and Gustafsson JA (2002). "Estrogen receptor beta in breast cancer." Endocr Relat Cancer **9**(1): 1-13.

Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthay K, Huang SK, Lee KD, Woodle MC, Lasic DD, Redemann C and et al. (1991). "Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11460-11464.

Pardal R, Clarke MF and Morrison SJ (2003). "Applying the principles of stem-cell biology to cancer." Nat Rev Cancer **3**(12): 895-902.

Pardue EL, Ibrahim S and Ramamurthi A (2008). "Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering." Organogenesis **4**(4): 203-214.

Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Moore D, Papahadjopoulos D and Benz CC (2002). "Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery." Clin Cancer Res **8**(4): 1172-1181.

Park JW, Kirpotin DB, Hong K, Shalaby R, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Papahadjopoulos D and Benz CC (2001). "Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes." J Control Release **74**(1-3): 95-113.

Paruthiyil S, Cvorov A, Tagliaferri M, Cohen I, Shtivelman E and Leitman DC (2011). "Estrogen receptor beta causes a G2 cell cycle arrest by inhibiting CDK1 activity through the regulation of cyclin B1, GADD45A, and BTG2." Breast Cancer Res Treat **129**(3): 777-784.

Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL and Leitman DC (2004). "Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest." Cancer Res **64**(1): 423-428.

Peer D and Margalit R (2004). "Loading mitomycin C inside long circulating hyaluronan targeted nano-liposomes increases its antitumor activity in three mice tumor models." Int J Cancer **108**(5): 780-789.

Peer D and Margalit R (2004). "Tumor-targeted hyaluronan nanoliposomes increase the antitumor activity of liposomal Doxorubicin in syngeneic and human xenograft mouse tumor models." Neoplasia **6**(4): 343-353.

Pettersson K, Delaunay F and Gustafsson JA (2000). "Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling." Oncogene **19**(43): 4970-4978.

Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG and Gustafsson JA (1997). "Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha." Mol Endocrinol **11**(10): 1486-1496.

Phillips TM, McBride WH and Pajonk F (2006). "The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation." J Natl Cancer Inst **98**(24): 1777-1785.

Ponta H, Sherman L and Herrlich PA (2003). "CD44: from adhesion molecules to signalling regulators." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(1): 33-45.

Qhattal HS and Liu X (2011). "Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes." Mol Pharm.

Renoir JM, Bouclier C, Seguin A, Marsaud V and Sola B (2008). "Antioestrogen-mediated cell cycle arrest and apoptosis induction in breast cancer and multiple myeloma cells." J Mol Endocrinol **40**(3): 101-112.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.

Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Milanezi F, Schmitt F and Paredes J (2011). "Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype." J Clin Pathol **64**(11): 937-946.

Ring A and Dowsett M (2004). "Mechanisms of tamoxifen resistance." Endocr Relat Cancer **11**(4): 643-658.

Robert J (2006). "De la chimiothérapie classique à la chimiothérapie ciblée : les mécanismes de l'oncogenèse aux niveaux cellulaire et moléculaire." Bull Cancer **93**: 5-16.

Rochlitz CF (2001). "Gene therapy of cancer." Swiss Med Wkly **131**(1-2): 4-9.

Roques C, Fromes Y and Fattal E (2009). "Hydrosoluble polymers for muscular gene delivery." Eur J Pharm Biopharm **72**(2): 378-390.

Ruponen M, Honkakoski P, Ronkko S, Pelkonen J, Tammi M and Urtti A (2003). "Extracellular and intracellular barriers in non-viral gene delivery." J Control Release **93**(2): 213-217.

Sahay G, Alakhova DY and Kabanov AV (2010). "Endocytosis of nanomedicines." J Control Release **145**(3): 182-195.

Schiff R, Massarweh S, Shou J and Osborne CK (2003). "Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response." Clin Cancer Res **9**(1 Pt 2): 447S-454S.

Semple SC, Harasym TO, Clow KA, Ansell SM, Klimuk SK and Hope MJ (2005). "Immunogenicity and rapid blood clearance of liposomes containing polyethylene glycol-lipid conjugates and nucleic Acid." J Pharmacol Exp Ther **312**(3): 1020-1026.

Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C and Gregoriadis G (1991). "Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles." Biochim Biophys Acta **1062**(1): 77-82.

Senior JH, Trimble KR and Maskiewicz R (1991). "Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application in vivo." Biochim Biophys Acta **1070**(1): 173-179.

Shi F, Wasungu L, Nomden A, Stuart MC, Polushkin E, Engberts JB and Hoekstra D (2002). "Interference of poly(ethylene glycol)-lipid analogues with cationic-lipid-mediated delivery of oligonucleotides; role of lipid exchangeability and non-lamellar transitions." Biochem J **366**(Pt 1): 333-341.

Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Parker LM, Anderson KS, Harris LN, Garber JE, Richardson AL, Schnitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS and Polyak K (2007). "Molecular definition of breast tumor heterogeneity." Cancer Cell **11**(3): 259-273.

Sidi AA, Ohana P, Benjamin S, Shalev M, Ransom JH, Lamm D, Hochberg A and Leibovitch I (2008). "Phase I/II marker lesion study of intravesical BC-819 DNA plasmid in H19 over expressing superficial bladder cancer refractory to bacillus Calmette-Guerin." J Urol **180**(6): 2379-2383.

Simoës S, Slepushkin V, Gaspar R, de Lima MC and Duzgunes N (1998). "Gene delivery by negatively charged ternary complexes of DNA, cationic liposomes and transferrin or fusigenic peptides." Gene Ther **5**(7): 955-964.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J and Dirks PB (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res **63**(18): 5821-5828.

Skelton TP, Zeng C, Nocks A and Stamenkovic I (1998). "Glycosylation provides both stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan." J Cell Biol **140**(2): 431-446.

Skliris GP, Munot K, Bell SM, Carder PJ, Lane S, Horgan K, Lansdown MR, Parkes AT, Hanby AM, Markham AF and Speirs V (2003). "Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model." J Pathol **201**(2): 213-220.

Souaze F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, Bruyneel E, Attoub S, Gespach C, Gompel A and Forgez P (2006). "Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression." Cancer Res **66**(12): 6243-6249.

Stephenson SM, Low PS and Lee RJ (2004). "Folate receptor-mediated targeting of liposomal drugs to cancer cells." Methods Enzymol **387**: 33-50.

Stern R (2003). "Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?" Glycobiology **13**(12): 105R-115R.

Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J and Gustafsson JA (2004). "Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(6): 1566-1571.

Suzuki F, Akahira J, Miura I, Suzuki T, Ito K, Hayashi S, Sasano H and Yaegashi N (2008). "Loss of estrogen receptor beta isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma." Cancer Sci **99**(12): 2365-2372.

Taetz S, Bochot A, Surace C, Arpicco S, Renoir JM, Schaefer UF, Marsaud V, Kerdine-Roemer S, Lehr CM and Fattal E (2009). "Hyaluronic acid-modified DOTAP/DOPE liposomes for the targeted delivery of anti-telomerase siRNA to CD44-expressing lung cancer cells." Oligonucleotides **19**(2): 103-116.

Tang MX and Szoka FC (1997). "The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes." Gene Ther **4**(8): 823-832.

Tasset D, Tora L, Fromental C, Scheer E and Chambon P (1990). "Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms." Cell **62**(6): 1177-1187.

Thomas CG, Strom A, Lindberg K and Gustafsson JA (2011). "Estrogen receptor beta decreases survival of p53-defective cancer cells after DNA damage by impairing G/M checkpoint signaling." Breast Cancer Res Treat **127**(2): 417-427.

Tiezzi DG, Valejo FA, Marana HR, Carrara HH, Benevides L, Antonio HM, Sicchieri RD, Milanezi CM, Silva JS and de Andrade JM (2011). "CD44(+)/CD24 (-) cells and lymph node metastasis in stage I and II invasive ductal carcinoma of the breast." Med Oncol.

- Toole BP (2004). "Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue." Nat Rev Cancer **4**(7): 528-539.
- Toriyabe N, Hayashi Y, Hyodo M and Harashima H (2011). "Synthesis and evaluation of stearylated hyaluronic acid for the active delivery of liposomes to liver endothelial cells." Biol Pharm Bull **34**(7): 1084-1089.
- Treeck O, Lattrich C, Springwald A and Ortmann O (2009). "Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells." Breast Cancer Res Treat.
- Tzircotis G, Thorne RF and Isacke CM (2005). "Chemotaxis towards hyaluronan is dependent on CD44 expression and modulated by cell type variation in CD44-hyaluronan binding." J Cell Sci **118**(Pt 21): 5119-5128.
- Viallard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL and Reiffers J (2001). "[Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]." Cancer Radiother **5**(2): 109-129.
- Visvader JE and Lindeman GJ (2008). "Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions." Nat Rev Cancer **8**(10): 755-768.
- Watson JD and Crick FH (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid." Nature **171**(4356): 737-738.
- West DC, Hampson IN, Arnold F and Kumar S (1985). "Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid." Science **228**(4705): 1324-1326.
- Wicha MS, Liu S and Dontu G (2006). "Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift." Cancer Res **66**(4): 1883-1890; discussion 1895-1886.
- Woodle MC, Matthay KK, Newman MS, Hidayat JE, Collins LR, Redemann C, Martin FJ and Papahadjopoulos D (1992). "Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes." Biochim Biophys Acta **1105**(2): 193-200.
- Xu L, Huang CC, Huang W, Tang WH, Rait A, Yin YZ, Cruz I, Xiang LM, Pirollo KF and Chang EH (2002). "Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes." Mol Cancer Ther **1**(5): 337-346.
- Xu L, Tang WH, Huang CC, Alexander W, Xiang LM, Pirollo KF, Rait A and Chang EH (2001). "Systemic p53 gene therapy of cancer with immunolipoplexes targeted by anti-transferrin receptor scFv." Mol Med **7**(10): 723-734.
- Xu Y and Szoka FC, Jr. (1996). "Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection." Biochemistry **35**(18): 5616-5623.
- Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT and Fan ST (2008). "Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer." Cancer Cell **13**(2): 153-166.

Yao J, Fan Y, Du R, Zhou J, Lu Y, Wang W, Ren J and Sun X (2010). "Amphoteric hyaluronic acid derivative for targeting gene delivery." Biomaterials **31**(35): 9357-9365.

Yerushalmi N and Margalit R (1998). "Hyaluronic acid-modified bioadhesive liposomes as local drug depots: effects of cellular and fluid dynamics on liposome retention at target sites." Arch Biochem Biophys **349**(1): 21-26.

Yu W, Pirollo KF, Rait A, Yu B, Xiang LM, Huang WQ, Zhou Q, Ertem G and Chang EH (2004). "A sterically stabilized immunolipoplex for systemic administration of a therapeutic gene." Gene Ther **11**(19): 1434-1440.

Zenke M, Steinlein P, Wagner E, Cotten M, Beug H and Birnstiel ML (1990). "Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(10): 3655-3659.

Zhang JS, Liu F and Huang L (2005). "Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity." Adv Drug Deliv Rev **57**(5): 689-698.

Zhang X, Koh CG, Yu B, Liu S, Piao L, Marcucci G, Lee RJ and Lee LJ (2009). "Transferrin receptor targeted lipopolyplexes for delivery of antisense oligonucleotide g3139 in a murine k562 xenograft model." Pharm Res **26**(6): 1516-1524.

Ziello JE, Huang Y and Jovin IS (2010). "Cellular endocytosis and gene delivery." Mol Med **16**(5-6): 222-229.

Zuidam NJ and Barenholz Y (1998). "Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery." Biochim Biophys Acta **1368**(1): 115-128.

Travaux Expérimentaux

Dans la partie bibliographique de ce manuscrit, les bénéfices de la thérapie génique dans le domaine des cancers ont été présentés, ainsi que l'apparition du processus cancéreux qui est accompagnée d'une réponse immunitaire insuffisante pour s'opposer à la mise en place du cancer. Les différentes classes de gènes d'intérêt pour apporter des réponses aux traitements des cancers ont été présentées et un exemple précis dans le cadre du cancer du sein a été détaillé. Les obstacles à l'administration d'ADN nu par voie intraveineuse ont ensuite été abordés, afin de valoriser les améliorations que la vectorisation est capable d'apporter dans la thérapie génique. La définition des différentes aptitudes nécessaires aux vecteurs a fait ressortir, premièrement des aspects de stabilité, deuxièmement des caractéristiques de furtivité permettant un ciblage passif par extravasation au niveau des tumeurs solides grâce à une circulation prolongée dans le sang, et troisièmement des compétences de ciblage actif cellulaire, afin de sélectionner stratégiquement la cellule devant exprimer le gène vectorisé.

Les travaux expérimentaux débutent par la présentation d'un article publié dans *Molecular Pharmaceutics*. Ces résultats, auxquels j'ai participé, s'inscrivent dans le cadre du doctorat du Dr Claudio Surace.

Les chapitres 1 et 2 viennent ensuite. Ainsi, les caractéristiques physico-chimiques, les aptitudes *in vitro*, ainsi que les mécanismes d'internalisation cellulaire de ce vecteur ont été approfondis grâce à sa complexation à un plasmide modèle codant pour la *Green Fluorescent Protein* GFP. Ces résultats représentent le premier chapitre des travaux expérimentaux.

Le second chapitre permet d'appréhender les aptitudes des lipoplexes *in vivo*, dans le cadre du cancer du sein, grâce à l'utilisation d'un plasmide codant pour le récepteur des estrogènes, ER β , potentiel suppresseur de tumeur.

Préambule

Lipoplexes Targeting the CD44 Hyaluronic Acid Receptor for Efficient Transfection of Breast Cancer Cells

Claudio Surace,^{†,‡,§} Silvia Arpicco,[‡] Amélie Dufay-Wojcicki,^{†,§}
Véronique Marsaud,^{†,§} Céline Bouclier,^{†,§} Denis Clay,^{||} Luigi Cattel,[‡]
Jack-Michel Renoir,^{†,§} and Elias Fattal^{*,†,§}

UMR CNRS 8612, Université Paris Sud 11, Châtenay-Malabry, F-92290, France, CNRS, F 92290 Châtenay-Malabry, France, Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Torino, Via Pietro Giuria 9, 10125 Torino, Italy, and IFR 89 Institut Andre Lwoff, Hopital Paul Brouse, 94270 Villejuif, France

Received October 27, 2008; Revised Manuscript Received April 22, 2009; Accepted May 4, 2009

Abstract: Lipoplexes containing a hyaluronic acid–dioleoylphosphatidylethanolamine (HA–DOPE) conjugate were designed to target the CD44 receptor on breast cancer cells. Cationic liposomes composed of a mixture of [2-(2,3-didodecyloxypropyl)hydroxyethyl]ammonium bromide (DE) and dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) with or without HA–DOPE were prepared, characterized, and used to form a complex with plasmid DNA pCMV-luc. Lipoplexes displayed a negative zeta potential and a mean diameter between 250–300 nm. Cytotoxicity and transfection efficiency of the lipoplexes were determined on the MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. Cytotoxicity was not modified by the presence of HA–DOPE. However HA–DOPE increased the level of transfection on CD44-expressing MDA-MB-231 cells compared to the MCF-7 line, which expresses very low levels of CD44. The transfection on the MDA-MB-231 cells was highly inhibited by anti-CD44 Hermes-1 antibody but not by the nonspecific anti-ErbB2 antibody. In conclusion, cationic liposomes containing the HA–DOPE conjugate mediated good transfection on CD44 expressing cell lines in culture.

Keywords: Cationic liposomes; CD44; hyaluronic acid; MCF-7; MDA-MB-231; targeting

Introduction

The design of highly efficient carriers for gene delivery has been approached by many research groups. These nonviral vectors should be able not only to cure diseases with genetic defects but also to treat and prevent major chronic diseases such as cancer, cardiovascular diseases and rheumatoid arthritis. Among the nonviral gene delivery systems, cationic liposomes have been widely investigated.

* Corresponding author: Elias Fattal, Ph.D., UMR CNRS 8612, Univ. Paris Sud 11, Faculté de Pharmacie, 5 Rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France. Tel: 33146835568. Fax: 33146619334. E-mail: elias.fattal@u-psud.fr.

[†] Univ. Paris Sud 11, CNRS UMR 8612.

[‡] Università degli Studi di Torino.

[§] CNRS.

^{||} Hopital Paul Brouse.

(1) Liu, Y.; Liggitt, D.; Zhong, W.; Tu, G.; Gaensler, K.; Debs, R. Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (42), 24864–70.

Their main advantages include low immunogenicity¹ and toxicity^{2,3} compared to viral vectors^{4,5} and their potential to transfect diverse tissue and cell types.^{3,6} Nevertheless, the low transfection efficiency, particularly *in vivo*, still remains

- (2) Stewart, M. J.; Plautz, G. E.; Del Buono, L.; Yang, Z. Y.; Xu, L.; Gao, X.; Huang, L.; Nabel, E. G.; Nabel, G. J. Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: safety and acute toxicity in mice. *Hum. Gene Ther.* **1992**, *3* (3), 267–75.
- (3) Zhu, N.; Liggitt, D.; Liu, Y.; Debs, R. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* **1993**, *261* (5118), 209–11.
- (4) Knowles, M. R.; Hohneker, K. W.; Zhou, Z.; Olsen, J. C.; Noah, T. L.; Hu, P. C.; Leigh, M. W.; Engelhardt, J. F.; Edwards, L. J.; Jones, K. R.; et al. A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *333* (13), 823–31.
- (5) Yang, Y.; Nunes, F. A.; Berencsi, K.; Furth, E. E.; Gonczol, E.; Wilson, J. M. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91* (10), 4407–11.

an issue for an extended use of cationic liposomes. Mostly, interactions with plasma proteins and poor targeted delivery are strong issues to circumvent. There is therefore a need for developing a new generation of DNA carriers. One strategy consists of designing cationic liposomes that are able to bind specifically to target cells avoiding uptake by nonrelevant cells. For this purpose, the alternative consists of the insertion into cationic liposomes of a modified lipid bearing a targeting moiety. Hyaluronic acid (HA) was described by several authors to be an interesting ligand (for review see ref 7). It is a naturally occurring high molecular weight (10^6 Da) glycosaminoglycan. It exists in living systems, and it is a major component of the extracellular matrix. The hyaluronic acid receptor CD44 is found at low levels on the surface of epithelial, hematopoietic and neuronal cells, and is overexpressed in many cancer cells.^{8,9} CD44 appears to regulate lymphocyte adhesion to cells of the high endothelial venules during lymphocyte migration,¹⁰ a process that has many similarities to the metastatic dissemination of solid tumors.¹¹ It is also implicated in the regulation of the proliferation of cancer cells.¹² Recently, the cancer stem cell theory¹³ has proposed that CD44 represents a marker of breast cancer stem cells.^{14,15} The relationship between tumor cells and hyaluronic acid receptors indicates that it may be possible to recruit hyaluronic acid for active targeting to

tumor cells bearing this receptor. If located on the surface of lipoplexes, hyaluronic acid can successfully bind to CD44 receptors resulting in attachment and internalization of the loaded carrier. The discovery that many cancer types overexpress this receptor led to the development of HA–drug conjugates^{16–18} and HA-modified particulate drug carrier systems^{19–24} that were able to target these tumors very specifically *in vitro* and *in vivo*. Among the carrier systems mentioned above, HA-modified liposomes were reported to be very efficient in the delivery of anticancer drugs like doxorubicin or mitomycin C.^{19–21} In mouse tumor models, these liposomes showed a much higher efficacy compared to nonmodified liposomes and also a longer systemic circulation time. Prolonged circulation time was attributed to a “hydrophilic coat effect” of the HA, and this occurs using high molecular weight HA²¹ despite the fact that, when present in the vascular compartment, high molecular weight HA were shown to be cleared from the circulation by the monocyte phagocytic system.²⁵ In terms of cytotoxicity, CD44-expressing cells were much more sensitive to the cytotoxic drugs encapsulated in HA-modified liposomes while toxicity for CD44 deficient cells was unchanged. Despite all these advances made, there was no attempt

- (6) Thierry, A. R.; Lunardi-Iskandar, Y.; Bryant, J. L.; Rabinovich, P.; Gallo, R. C.; Mahan, L. C. Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92* (21), 9742–6.
- (7) Platt, V. M.; Szoka, F. C., Jr. Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Mol. Pharmaceutics* **2008**, *5* (4), 474–86.
- (8) Zoller, M. CD44: physiological expression of distinct isoforms as evidence for organ-specific metastasis formation. *J. Mol. Med.* **1995**, *73* (9), 425–38.
- (9) Ohene-Abuakwa, Y.; Pignatelli, M. Adhesion molecules in cancer biology. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**, *465*, 115–26.
- (10) Gallatin, M.; St John, T. P.; Siegelman, M.; Reichert, R.; Butcher, E. C.; Weissman, I. L. Lymphocyte homing receptors. *Cell* **1986**, *44* (5), 673–80.
- (11) Nemecek, R. E.; Toole, B. P.; Knudson, W. The cell surface hyaluronate binding sites of invasive human bladder carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *149* (1), 249–57.
- (12) Bartolazzi, A.; Peach, R.; Aruffo, A.; Stamenkovic, I. Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J. Exp. Med.* **1994**, *180* (1), 53–66.
- (13) Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F.; Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **2001**, *414* (6859), 105–11.
- (14) Patrawala, L.; Calhoun, T.; Schneider-Broussard, R.; Li, H.; Bhatia, B.; Tang, S.; Reilly, J. G.; Chandra, D.; Zhou, J.; Claypool, K.; Coghlan, L.; Tang, D. G. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* **2006**, *25* (12), 1696–708.
- (15) Prince, M. E.; Sivanandan, R.; Kaczorowski, A.; Wolf, G. T.; Kaplan, M. J.; Dalerba, P.; Weissman, I. L.; Clarke, M. F.; Ailles, L. E. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104* (3), 973–8.
- (16) Luo, Y.; Ziebell, M. R.; Prestwich, G. D. A hyaluronic acid-taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (2), 208–18.
- (17) Luo, Y.; Bernshaw, N. J.; Lu, Z. R.; Kopecek, J.; Prestwich, G. D. Targeted delivery of doxorubicin by HPMA copolymer-hyaluronan bioconjugates. *Pharm. Res.* **2002**, *19* (4), 396–402.
- (18) Asayama, S.; Nogawa, M.; Takei, Y.; Akaike, T.; Maruyama, A. Synthesis of novel polyampholyte comb-type copolymers consisting of a poly(L-lysine) backbone and hyaluronic acid side chains for a DNA carrier. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9* (4), 476–81.
- (19) Eliaz, R. E.; Szoka, F. C., Jr. Liposome-encapsulated doxorubicin targeted to CD44: a strategy to kill CD44-overexpressing tumor cells. *Cancer Res.* **2001**, *61* (6), 2592–601.
- (20) Peer, D.; Margalit, R. Loading mitomycin C inside long circulating hyaluronan targeted nano-liposomes increases its antitumor activity in three mice tumor models. *Int. J. Cancer* **2004**, *108* (5), 780–9.
- (21) Peer, D.; Margalit, R. Tumor-targeted hyaluronan nanoliposomes increase the antitumor activity of liposomal Doxorubicin in syngeneic and human xenograft mouse tumor models. *Neoplasia* **2004**, *6* (4), 343–53.
- (22) Hyung, W.; Ko, H.; Park, J.; Lim, E.; Park, S. B.; Park, Y. J.; Yoon, H. G.; Suh, J. S.; Haam, S.; Huh, Y. M. Novel hyaluronic acid (HA) coated drug carriers (HCDCs) for human breast cancer treatment. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99* (2), 442–54.
- (23) Takei, Y.; Maruyama, A.; Ferdous, A.; Nishimura, Y.; Kawano, S.; Ikejima, K.; Okumura, S.; Asayama, S.; Nogawa, M.; Hashimoto, M.; Makino, Y.; Kinoshita, M.; Watanabe, S.; Akaike, T.; Lemasters, J. J.; Sato, N. Targeted gene delivery to sinusoidal endothelial cells: DNA nanoassociate bearing hyaluronan-glycocalyx. *FASEB J.* **2004**, *18* (6), 699–701.
- (24) Chono, S.; Li, S. D.; Conwell, C. C.; Huang, L. An efficient and low immunostimulatory nanoparticle formulation for systemic siRNA delivery to the tumor. *J. Controlled Release* **2008**, *131* (1), 64–9.
- (25) Harris, E. N.; Kyosseva, S. V.; Weigel, J. A.; Weigel, P. H. Expression, processing, and glycosaminoglycan binding activity of the recombinant human 315-kDa hyaluronic acid receptor for endocytosis (HARE). *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (5), 2785–97.

described in the literature to attach hyaluronic acid to cationic liposomes to deliver DNA to cancer cells. In this paper, the transfection efficiency of lipoplexes containing a HA conjugate to dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) was tested in human breast cancer lines (MCF-7 and MDA-MB-231) and compared to plain lipoplexes. Lipoplexes containing the conjugate displayed a greater transfection efficacy to cells expressing a high level of CD44 receptor with a very clear selectivity.

Experimental Section

Chemicals. High molecular weight hyaluronic acid (HA) (1500 kDa) was purchased from Fluka (Saint-Quentin-Fallavier, France), L-alpha-dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide (EDAC), DNase I and molybdenum blue spray reagent 1.3% were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) and ethidium bromide (EtBr) from Bio-Rad (Marne la coquette, France). Dichloromethane and chloroform were provided by Carlo Erba Reagenti (Milano, Italy). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), PennStrep and phosphate buffer saline (PBS) were from Gibco (Eragny, France). Fetal calf serum (FCS) was purchased from Eurobio (Courtaboeuf, France). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt (MTS) [Cell Titer 96AQ_{ueous} One Solution Reagent] was from Promega (Charbonnières-les-Bains, France). The Hermes-1 supernatant hybridoma antibody was provided by the Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Iowa City, IA), and the primary rabbit polyclonal anti-HER-2/*neu* antibody Neu(C-18) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Vectastain kit (antirat ABC peroxidase pk6104) was purchased from Vector Laboratories (Biovalley, Conches, France).

General Procedures. *Synthesis and Characterization of HA-DOPE Conjugate.* HA-DOPE conjugate was synthesized by a modified reaction described by Yerushalmi and Margalit.²⁶ Briefly, 14 mg of HA was dissolved in 5 mL of distilled water and preactivated for 2 h at 37 °C by incubation with 6 mg of EDAC at pH 4 adjusted by titration with HCl 0.1 N. Subsequently, a suspension of DOPE (360 µg) was added to the HA solution and the pH was adjusted at 8.6 with a 0.1 M borate buffer pH 9.4. The reaction proceeded for 24 h at 37 °C. The solution containing the HA-DOPE conjugate was purified by ultrafiltration (MWCO 100 kDa) (Amicon Ultrafiltration, Millipore Corporate, Saint Quentin en Yvelines, France). Through this process, the HA-DOPE conjugate was completely retained over the filter, while EDAC and all other byproducts of the reaction were washed away. DOPE that did not react with HA was present as very small traces and was also eliminated during ultrafiltration. To ensure total elimination of DOPE (as demonstrated by

thin layer chromatography) the mixture was further dialyzed. Dialysis was carried out using a Spectra/Por regenerated cellulose membrane with a molecular cutoff of 12,000–14,000. Sample volume was 1.5 mL while the volume of the dialysis fluid was 3 L. The dialysis bag was changed 5 times every 10 h ensuring elimination of the last traces of DOPE. Although DOPE is known to self-aggregate, the dilution was such that it allows total removal of DOPE. These purification methods do not allow removal of free HA which remained in the solution containing the HA-DOPE conjugate. The final product was then lyophilized and the amount of DOPE linked to HA was quantified after resuspension in distilled water by a phosphate assay using the method of Bartlett.²⁷ The reactions were monitored by TLC using F₂₅₄ silica gel precoated sheets (Saint-Quentin-Fallavier, France). After migration of the mobile phase, sheets were exposed to iodine vapors, solutions of molybdenum blue and ninhydrin (2,2-dihydroxyindene-1,3-dione) solution (100 mg/100 mL ethanol).

Preparation and Characterization of Liposomes and Lipoplexes. The cationic lipid [2-(2,3-didodecyloxypropyl)-hydroxyethyl] ammonium bromide (DE) was synthesized as previously described,²⁸ dissolved in chloroform and mixed in 1:1 ratio (w/w) with a solution of DOPE in chloroform. The mixture was then dried under vacuum. For the preparation numbered 1, the lipid film was hydrated with Milli-Q water to a final concentration of 1 mg/mL of lipids and vortexed. In order to prepare HA-DOPE containing liposomes (2 to 5) the conjugate was dissolved in Milli-Q water and added in increasing amounts to the lipid suspensions. The different preparations contained the following amounts of HA-DOPE: 0.01 mg (preparation numbered 2); 0.04 mg (preparation numbered 3); 0.10 mg (preparation numbered 4) and 0.15 mg (preparation numbered 5). Lipid concentration was adjusted to a final concentration of 1 mg/mL. Finally, the aqueous dispersions were vortexed for 1 min at room temperature. Liposomes containing HA alone instead of HA-DOPE conjugate were prepared as described above.

Lipoplexes were prepared at a 2:1 lipid/DNA ratio (w/w). Plasmid DNA pCMV-luc (1 µg) was complexed with plain cationic liposomes (preparation 1) or cationic liposomes containing increasing amounts of HA-DOPE as described above (preparations 2, 3, 4 and 5). After formation, lipoplexes were incubated at room temperature for 30 min. The main physicochemical characteristics of both liposomes and lipoplexes were then evaluated through size and zeta potential measurements (Malvern-Zetasizer-nano ZS, Malvern Worches-treshire, U.K.).

Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM). DE:DOPE HA-DOPE 0.1 mg liposomes and lipoplex containing pCMV-luc plasmid DNA at a 2:1 w/w

(26) Yerushalmi, N.; Margalit, R. Hyaluronic acid-modified bioadhesive liposomes as local drug depots: effects of cellular and fluid dynamics on liposome retention at target sites. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *349* (1), 21–6.

(27) Bartlett, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234* (3), 466–8.

(28) Arpicco, S.; Canevari, S.; Ceruti, M.; Galmozzi, E.; Rocco, F.; Cattel, L. Synthesis, characterization and transfection activity of new saturated and unsaturated cationic lipids. *Farmaco* **2004**, *59* (11), 869–78.

lipid/DNA ratio (preparation 4) were prepared and observed using the cryogenic transmission electron microscopy technique (cryo-TEM). Samples preparation was performed as follows: 5 μ L of each formulation was placed on 300 mesh Lacey Formvar/Carbon coated copper grids (Ted Pella Inc. Redding, CA). The excess amount of liquid was then blotted with a Whatman No.5 filter paper, and the grids were immediately plunged into a liquid ethane bath cooled with liquid nitrogen using a Leica EM CPC Cryoworkstation (Leica Microsystems SAS, Rueil Malmaison, France). Afterward, grids were constantly maintained in liquid nitrogen and carefully transferred in a cryo-holder (626 DH Gatan). Preparations were investigated at -170 °C on a Cryo-JEM 2100 JEOL electron microscope operating at an accelerating voltage of 200 kV under low electron dose.

DNase I Sensitivity Assay. In order to obtain lipoplexes at a ratio ranging from 1:1 to 5:1 lipid:DNA (w/w), plasmid DNA pCMV-luc (1 μ g) was complexed with cationic liposomes (preparation 1) and cationic liposomes containing increasing amounts of HA-DOPE (preparations 2, 3, 4 and 5). Subsequently, they were treated with 10 μ L of DNase I (at a final concentration of 1 μ g/mL) in the presence of 20 mM of MgCl₂ and incubated for 10 min at 37 °C. The reaction was then halted by adding EDTA (to a final concentration of 200 mM) and incubating at 60 °C for 20 min in a water bath. Lipids were then extracted from the aqueous DNA sample with 30 μ L of a chloroform saturated solution of phenol and centrifuged at 10000g for 5 min. The aqueous DNA containing supernatants were separated, and 15 μ L was loaded on a 1% agarose gel (prestained with ethidium bromide); 6 \times loading buffer made of 0.25% bromophenol blue in 30% w/v glycerol in H₂O was added to each complex, and gel electrophoresis was carried out at 110 V for 1 h in TAE buffer pH 8 (20 mM tris-acetate, 1 mM EDTA). As a control, the same preparations, treated identically but without DNase I, were submitted to an agarose gel electrophoresis in the same conditions as treated samples.

Cell Culture. Human breast cancer MDA-MB-231 and MCF-7 cells were cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), PennStrep 1% and glutamine 1%. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

CD44 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The mRNA level of CD44 standard and isoforms was examined by reverse transcription PCR (RT-PCR). Total RNA was extracted from MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines with Trizol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions, and the yield was quantified by UV analysis at 260/280 nm. Reverse transcription was performed with 5 μ g of total mRNA in the presence of 5 μ L of random primers (40 ng/mL) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 1 μ L of dNTP (containing a mixture of every nucleotide at 1 mM (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) in a total volume of 12 μ L of H₂O. The mixture was incubated at 65 °C for 5 min and kept in ice. Subsequently, 4 μ L of the first strand buffer 5 \times

(Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 2 μ L of DTT 0.1 M, 1 μ L of RNase out (40 U/L) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 1 μ L of M-MLV reverse transcriptase (200 U/ μ L) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) were added and incubated for 10 min at 25 °C, followed by 50 min at 37 °C and finally 15 min at 60 °C in order to inactivate the enzyme. A human CD44 cDNA was amplified by PCR using the following primers: CD44^{S5}, 5' GCA GCA CTT CAG GAG GTT ACA T 3'; CD44^{S11}, 5' CAA GAG GGA TGC CAA GAT GAT 3'. The relative expression of actin was used as reference using the following primers: 5' TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA 3' and 5' CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG 3'. Briefly, 2 μ L of cDNA was added to a mixture of 2.5 μ L of amplification buffer (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 0.5 μ L of dNTP 10 mM, 0.75 μ L of MgCl₂ 50 mM, 0.2 μ L of Taq platinum polymerase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 1 μ L of CD44 primers 10 μ M (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 0.15 μ L of actin primers 10 μ M (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) in a total volume of 25 μ L of H₂O. The PCR reactions were carried out as follows: 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min over 35 cycles, followed by 72 °C for 10 min in a PCR Crocodile III vector (AppliGene Oncor, Illkirch, France). PCR products were then analyzed on a 2% agarose gel.

Quantitative PCR. ARN samples were prepared and reverse-transcribed as previously described in RT PCR above. The Q PCR was performed on Roche LightCycler version 3.5 during 40 cycles of amplification at 62 °C (T_m). The sequences of the primers (Eurogentec, Liège, Belgium) used in this study are 5' CA-GCA-CTT-CAG-GAG-GTT-ACA-T 3' (sense), 5' CAA-GAG-GGA-TGC-CAA-GAT-GAT 3' (antisense). The cycle at which the fluorescence exceeds a detection threshold, called crossing point, C_p, was determined since it correlates to the number of target cDNA molecules present in the added cDNA.

Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). Analyses of MCF-7 and MDA-MB-231 by cell sorting were performed in a flow cytometer FACS calibur Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ). After rinsing with PBS-FCS 1%, 10⁵ cells were incubated 25 min at 4 °C with a CD44-labeled FITC antibody (Clone J.173, Beckman Coulter, California) and with the viability dye 7-AAD (Beckman Coulter, California) according to manufacturer's instructions, diluted in PBS-FCS 1%. Then, the cells were washed twice in PBS-FCS 1% before being recovered in DMEM-FCS 1%.

Cell Viability. MCF-7 and MDA-MB-231 were seeded in DMEM with 10% FCS in 96 well plates (1 \times 10⁴ cells/well) and incubated one day prior to the experiment in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Preparations 1, 2, 3, 4, and 5 were incubated with plasmid pCMV-Luc for 30 min at room temperature in order to obtain a lipid/DNA charge ratio of 2:1 w/w. Cell viability was evaluated for three different concentrations of lipoplexes maintaining the same lipid/DNA ratio [15 μ g/mL (10 μ g of lipid:5 μ g of DNA), 7.5 μ g/mL (5 μ g of lipid:2.5 μ g of DNA), 3.75

$\mu\text{g/mL}$ (2.50 μg of lipid: 1.25 μg of DNA)]. Lipoplexes were then incubated with cells in serum free medium. Medium was replaced after 12 h with fresh medium containing 10% FCS, and incubation was continued in the same conditions. Cell viability was quantified after 24, 48, and 72 h using the Cell Titer 96A_{queous} One Solution cell proliferation assay (MTS salt)²⁹ and monitoring the absorbance at 490 nm (Elisa Microplate Reader, Merteck Inc., Korea) after suitable color development (1 h). Cell viability was determined by comparing the amount of MTS reduced by cells incubated with lipoplexes to the amount of MTS reduced in control cells.

Transfection Experiments. Cells (1×10^5) were seeded in 6 well-plates one day before the transfection experiments and grown in the appropriate medium with 10% FCS. The cell lines reached 40–50% confluence at the time of transfection, prepared in the same manner as described above, and were incubated with cells in serum free medium at a concentration of 7.5 $\mu\text{g/mL}$. The same assay was carried out also with lipoplexes containing HA instead of HA–DOPE conjugate. Transfection was performed in serum-free medium by adding the complexes dropwise to the cells followed by incubation in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 12 h. Medium was then replaced with fresh medium containing 10% FCS and incubation continued for an additional 42 h.

Luciferase Assay. Transfected cells were rinsed with phosphate buffer saline (PBS) and lysed in 250 μL of the luciferase buffer (Tris 25 mM, H₃PO₄ pH 7.8, MgCl₂ 10 mM, Triton X100 1%, glycerol 15%, EDTA 1 mM, DTT 1 mM). Cell lysates were cleared by centrifugation (10 min, 14000g, 4 °C). Quantification of the luciferase activity was performed in a luminometer (Lumat LB 9507, Berthold, Bad Wildbad, Germany) after addition of ATP plus luciferin. Results were normalized to the protein content measured by the Bradford assay,³⁰ and the data are expressed as relative light units (RLU) per mg of protein. Luciferase assays were performed in triplicate from at least three independent experiments. Comparison of relative induction between plain liposomes and liposomes containing HA–DOPE conjugate was determined by nonparametric Student *t* test. A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.

Transfection Assay in the Presence of Anti-CD44 Hermes-1 and Anti-ErbB2 Antibodies. A transfection assay in the presence of an anti-CD44 antibody was carried out. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with increasing amounts (0.01, 0.1, 0.5, and 1 $\mu\text{g/mL}$) of the supernatant anti-CD44 primary antibody Hermes-1 or Anti-ErbB2 antibody (0.5 and 1 $\mu\text{g/mL}$) for 2 h at 37 °C before adding the

lipoplexes (preparations 1 and 4). Luciferase activity assay was carried out as described above.

Results

Synthesis of HA–DOPE Conjugate. Hyaluronic acid is a polymer composed of D-glucuronic acid and D-N-acetylglucosamine, linked together via alternating β -1,4 and β -1,3 glycosidic bonds.³¹ In our procedure, HA was preactivated and added to a DOPE solution in order to obtain an HA–DOPE conjugate which can be introduced during the lipid film hydration step in liposome preparation procedure. The HA–DOPE conjugate was prepared using a reaction in which the DOPE amino group is randomly linked to the carboxylic residues of HA. Through the condensation reaction between HA and DOPE, an amidic bond between the carboxylic group of HA and amino group of DOPE was formed. This linkage was obtained by using a soluble carbodiimide (EDAC) that activated the carboxylic residues of HA making them available for the reaction with the DOPE amino group.

At the beginning of the reaction, the condensing agent (EDAC) was added to the hyaluronic acid solution in water at pH 4 because carbodiimide reacts with carboxylic groups to give an intermediate *O*-acylisourea in acid buffer. Then DOPE was introduced in the mixture, and because the reaction between an amino group and an activated carboxylic residue is particularly favored in a water and basic medium, the pH was adjusted to 8.6. The reaction was monitored by TLC and stopped after 24 h. After purification and lyophilization, the conjugate was again characterized by TLC. Spots were ninhydrin negative and phosphate and iodine positive. The single spot of HA–DOPE on TLC has $R_f = 0$ while DOPE has $R_f = 0.7$. This latest spot did not appear on the TLC, meaning that all free DOPE was removed by the purification procedure. The quantitative lipid assay revealed that in the conjugate the final ratio was 3 μg of DOPE/mg of HA.

Characterization of Liposomes and Lipoplexes. Lipid films made of DE:DOPE 1:1 w/w were hydrated with Milli-Q water (preparation numbered 1) and with increasing amounts of a HA–DOPE solution [0.01 mg (preparation numbered 2); 0.04 mg (preparation numbered 3); 0.10 mg (preparation numbered 4); 0.15 mg (preparation numbered 5)] to obtain a final lipid concentration of 1 mg/mL for each sample. The physicochemical characteristics of liposomes containing different amounts of HA–DOPE conjugate were then evaluated by size and zeta potential measurements (Table 1). The liposomes containing only DE/DOPE showed a mean diameter around 450 nm, but as the amount of HA–DOPE conjugate concentration was increased in the preparation, the size increased up to around 900 nm, and the polydispersity index (PDI) increased in the same way. The diameter and the PDI raised similarly when HA was physically attached

(29) Riss, T. L.; Moravec, R. A. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev. Technol.* **2004**, 2 (1), 51–62.

(30) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–54.

(31) Chong, B. F.; Blank, L. M.; McLaughlin, R.; Nielsen, L. K. Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 66 (4), 341–51.

Table 1. Size and Zeta Potential Values of Liposomes and Lipoplexes^a

preparations	liposome size (nm)	PDI	liposome zeta potential (mV)	lipoplex size (nm)	PDI	lipoplexes zeta potential (mV)
DE	450 ± 47	0.53	91.8 ± 2.1	356 ± 18	0.20	-15.7 ± 0.4
DE HA-DOPE						
0.01	548 ± 53	0.59	89.5 ± 0.5	350 ± 28	0.19	-22.9 ± 0.7
0.04	574 ± 25	0.55	80.1 ± 2.0	367 ± 28	0.24	-30.6 ± 0.7
0.10	659 ± 36	0.59	64.6 ± 2.1	310 ± 12	0.21	-33.1 ± 0.8
0.15	894 ± 59	0.58	56.9 ± 1.6	256 ± 27	0.25	-46.1 ± 0.9

^a Liposomes were prepared as 1:1 (w/w) of DE:DOPE and increasing amounts of HA-DOPE and then mixed with DNA at 2:1 lipid:DNA ratio. Results are expressed as means ± SD of three independent experiments.

Table 2. Size and Zeta Potential Values of Liposomes and Lipoplexes^a

preparations	liposome size (nm)	PDI	liposome zeta potential (mV)	lipoplex size (nm)	PDI	lipoplexes zeta potential (mV)
DE	531 ± 12	0.61	87.2 ± 1.5	403 ± 45	0.47	-21.9 ± 1.8
DE HA						
0.01	607 ± 72	0.59	84.5 ± 1.0	353 ± 13	0.43	-26.3 ± 0.5
0.04	641 ± 16	0.63	67.0 ± 1.0	334 ± 13	0.40	-27.9 ± 0.3
0.10	868 ± 20	0.56	57.6 ± 1.2	574 ± 42	0.63	-32.4 ± 0.4
0.15	888 ± 68	0.55	60.1 ± 0.4	520 ± 39	0.53	-40.1 ± 0.5

^a Liposomes were prepared as 1:1 (w/w) of DE:DOPE and increasing amounts of unconjugated HA and then mixed with DNA at 2:1 lipid:DNA ratio. Results are expressed as means ± SD of three independent experiments.

to liposomes (Table 1). Cationic liposomes displayed a net positive zeta potential value decreasing from +91.8 mV to +56.9 mV as the amount of HA-DOPE conjugate increased. Liposomes containing HA alone instead of HA-DOPE conjugate were also prepared. Size and zeta potential values were measured to evaluate whether the presence of HA linked to DOPE could change either the size or the zeta potential of the liposomes. The results showed that liposomes containing HA are in the same range as those containing the HA-DOPE conjugate (Tables 1 and 2). The same observation could be made for zeta potential (Tables 1 and 2).

The size and zeta potential measurements of lipoplexes prepared at a 2:1 lipid/DNA ratio (w/w) were also performed. Lipoplexes showed very slight size reductions according to the amount of conjugate (from 350 to 300 nm) reaching 250 nm for the largest amount of HA-DOPE (Table 1). As opposed to empty liposomes, the polydispersity index was low and DNA was shown to compact liposomes and decreases their size. This was not the case, particularly for the PDI, when lipoplexes contained physically attached HA (Table 2). Zeta potential of lipoplexes turned out to be negative for all samples particularly when increasing the amounts of the conjugate or free HA; it decreased proportionally to the quantity of conjugate or free HA added to the lipoplexes.

Cryo-Tem micrographs of cationic liposomes indicate the coexistence of spherical unilamellar, bilamellar and invaginated vesicles with some tendency to aggregation (Figure 1A). The heterogeneity of vesicle population correlated well with the data obtained from size measurements where plain liposomes containing HA showed a very high polydispersity index. After addition of pCMV-luc plasmid DNA, a drastic

change in vesicle morphology occurred (Figure 1B). Lipoplexes display a reduction of size heterogeneity and a structure characterized by a dense spherical core with homogeneous shapes, and it is no more possible to observe the unilamellar structure as in the initial liposomal suspension.

Sensitivity of Lipoplexes to DNase I. Tight association of cationic liposomes with DNA protects plasmid from DNase I digestion. The protection is diminished when the complex dissociates or if the DNA is accessible to enzyme degradation. Thus the sensitivity of DNA to DNase I digestion was used to assess the degree of DNA exposure within the lipid-DNA complex. DNase I protection experiments were carried out across the entire range of the lipid/DNA charge ratios (Figure 2A,B). Following DNA digestion, the remaining DNA was separated from the lipid and DNase I and loaded on a 1% agarose gel. When plasmid DNA was incubated with DNase I, it was completely digested within 10 min (band intensity of naked DNA was no longer visible). Band intensities of inaccessible and therefore undigested DNA associated with the cationic liposomes (preparations 1 and 4) across the range of 2:1 to 5:1 (lipid: DNA w/w) were present for all samples demonstrating a protection of DNA versus DNase I digestion (Figure 2A,B). However, at low lipid:DNA ratio (1:1) a stronger band was observed for HA-DOPE conjugate containing liposomes, suggesting a better protection of DNA in these latest cases (Figure 2B). Controls on both types of lipoplexes that did not undergo DNase treatment (Figure 2C,D) showed qualitatively that some of the DNA was degraded particularly at low lipid:DNA ratios.

Quantification of CD44-mRNA. The mRNA level of CD44 standard and isoforms was examined first by RT-PCR and found to be expressed in both MDA-MB-231 and MCF-7

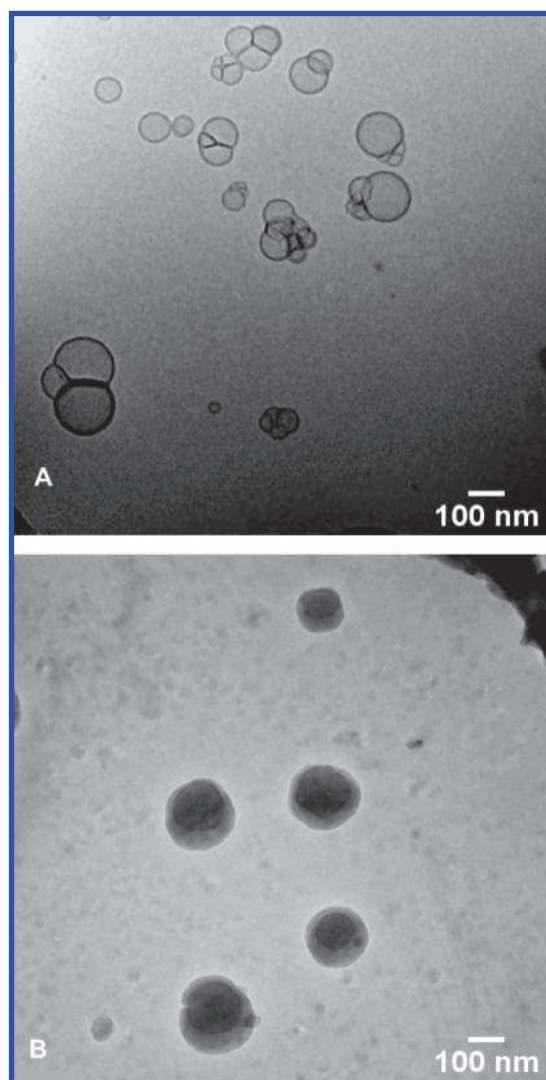


Figure 1. CryoTEM observation of cationic liposomes (A) and lipoplexes (B) both containing HA-DOPE conjugate (preparation 4 HA-DOPE 0.10). Lipoplexes were obtained by mixing cationic liposomes with DNA at 2:1 lipid:DNA ratio. Bar = 100 nm.

breast cell lines (Figure 3A). The expression of actin was used as an internal control. After amplification, the actin fragment size is 610 bp while for CD44 the size is 260 bp (Figure 3A). The levels of CD44-mRNA relative to actin are consistently higher in MDA-MB-231 cells as compared to MCF-7 cells, even though there is a weak band in MCF-7 which suggests a very low expression of CD44 receptor on this cell line. Further the analysis of CD44-mRNA expression was carried out by Q PCR showing that MDA-MB-231 cells ($C_p = 18.1$) contain more CD44-mRNA than MCF-7 cells ($C_p = 26.25$, in gray), indicating a 284-fold increase of CD44-mRNA in MDA-MB-231 compared to MCF-7. In final, FACS analyses revealed that both MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells express CD44 but at different levels since the MFI (median fluorescence intensity) are respectively 36.58 (MCF-7) (Figure 3B) and 614.07 (MDA-

MB-231) (Figure 3C) indicating a 17-fold increase of CD44 expression at the surface of MDA-MB-231 compared to MCF-7 cells, and in agreement with Q PCR data.

Cell Viability. Three different concentrations of lipoplexes (15 $\mu\text{g/mL}$, 7.5 $\mu\text{g/mL}$ and 3.75 $\mu\text{g/mL}$) maintaining the same lipid/DNA ratio (2:1 w/w) were assessed for cytotoxicity, but only the results concerning the concentration of 7.5 $\mu\text{g/mL}$ are displayed in Figure 4. Actually, using 15 μg of lipoplexes (10 μg of liposome + 5 μg of DNA) was shown to be toxic both for MDA-MB-231 and MCF-7 cells in particular; after 72 h cell viability was less than 60%. Under these conditions, the presence of the conjugate did not modify the cytotoxicity compared to the plain cationic lipoplexes. Transfection assays were then performed at a concentration in lipoplexes of 7.5 $\mu\text{g/mL}$ as this was shown to be the most efficient and least toxic amount of lipoplexes that could be used (Figure 4).

Transfection Experiments. Transfection efficiency using lipoplexes either containing the HA-DOPE conjugate or not was evaluated on MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Cationic liposomes containing HA-DOPE were found to be more efficient than the ones containing only DE/DOPE 1:1 in both MCF-7 and MDA-MB-231 cells. In particular, the transfection efficiency was shown to be higher when increasing the amount of HA-DOPE conjugate in liposomes. Lipoplexes containing 0.1 mg of HA-DOPE (preparation 4, relative induction = 257.69 ± 50.57 corresponding to 7.77×10^7 RLU/mg of protein) are 2–3 times more efficient than lipoplexes without conjugate in MCF-7 (preparation 1 corresponding to 3.33×10^7 RLU/mg) ($p < 0.05$) (Figure 5A) and 6–7 times more efficient in MDA-MB-231 cells (preparation 4, relative induction = 814 ± 47 corresponding to 1.40×10^8 RLU/mg of protein compared to 2.1×10^7 RLU/mg for preparation 1, $p < 0.05$) (Figure 5B). Since preparation 4 had the highest transfection rate among lipoplexes containing different amounts of HA-DOPE conjugate, this formulation was selected for further testing and the results were compared to lipoplexes that did not contain the conjugate (preparation 1). In order to assess whether the presence of the DOPE linked to HA could improve the transfection efficiency, the same assay was then performed with liposomes containing HA alone instead of HA-DOPE conjugate. Lipoplexes associated physically with HA were found to be less efficient than HA-DOPE lipoplexes in both MCF-7 ($p < 0.05$) and MDA-MB-231 cells ($p < 0.05$) (Figure 5A,B).

Effect of Anti-CD44 Hermes-1 Antibody on Lipoplex Transfection Efficiency. As shown by CD44 RT-PCR Q PCR and FACS assays, high CD44 expression was detected in MDA-MB-231 cells, while poor expression was seen in MCF-7. Hermes-1 antibody is a supernatant rat IgG2 which recognizes the N-terminal hyaluronate binding domain of CD44 receptor (both CD44s and its

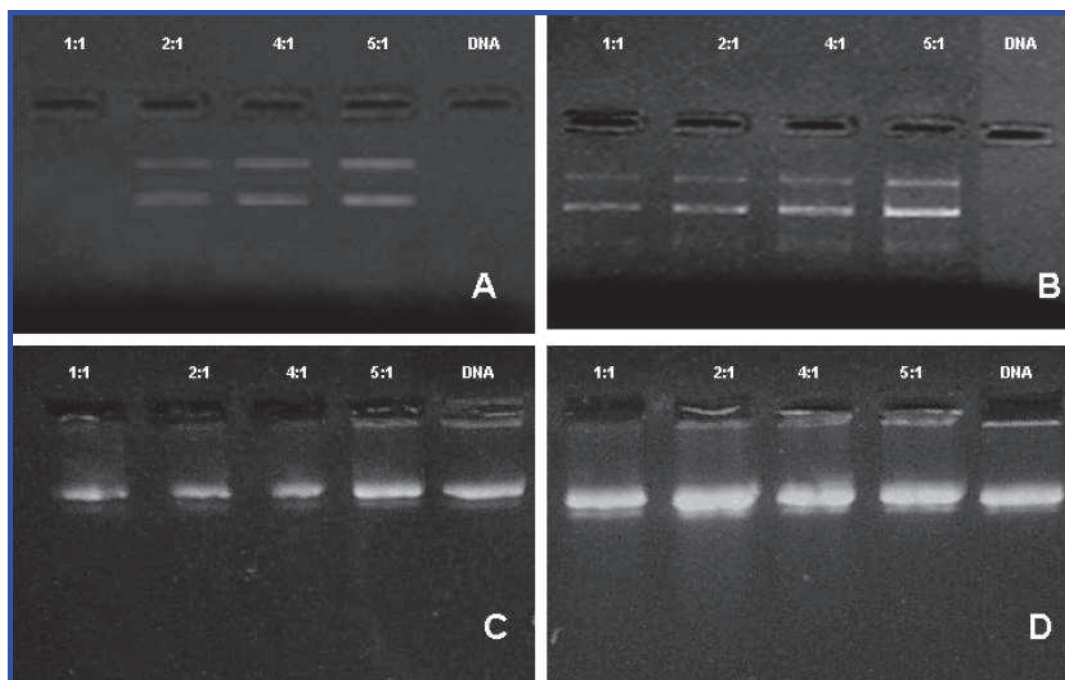


Figure 2. DNase I sensitivity assays of DE:DOPE 1:1 liposomes (A) and DE:DOPE 1:1 HA–DOPE 0.10 liposomes (B) complexed to DNA at increasing lipid:DNA ratios. Lipoplexes and naked DNA were incubated with DNase I, extracted and separated on a 1% agarose gel. Similar experiment was carried out on DE:DOPE 1:1 liposomes (C) and DE:DOPE 1:1 HA–DOPE 0.10 liposomes (D) complexed to DNA at increasing lipid:DNA ratios without treatment with DNase. I.

isoforms CD44v)³² and inhibits hyaluronic acid binding.³³ Transfection assay was performed in both cell lines previously treated with increasing amounts of supernatant antibody Hermes-1 in order to saturate and block the CD44 receptors and were then transfected with DE/DOPE 1:1 (preparation 1) (Figure 6A,B) and 0.1 mg HA–DOPE DE/DOPE 1:1 lipoplexes (preparation 4) (Figure 6A,B). MCF-7 cells did not show appreciable inhibition of luciferase activity whether they were transfected in the presence of Hermes-1 antibody or not ($p = 0.07$) (Figure 6A). However, a clear reduction of transfection was shown in MDA-MB-231 cells by increasing the amount of antibody (Figure 6B). In particular an inhibition of the efficiency of 70% in comparison with the control was seen when cells were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-CD44 Hermes-1 and then transfected with preparation 4 ($p < 0.05$) (Figure 6B). In both cases, transfection was not inhibited by anti-ErbB2 antibody used as control (Figure 6A,B).

Discussion

The aim of the present study was to design a specific nonviral delivery system that is able to target the hyaluronan receptor CD44 present on breast cancer cells. To achieve this goal, a HA–DOPE conjugate was synthesized and introduced into cationic lipids during liposome formation. Using this approach, it was possible to control and optimize the amount of conjugate present onto liposome surface, and therefore to assess the most efficient and least toxic quantity necessary for optimal cell transfection. While others' attempts to attach HA to liposomes consisted of binding HA to the surface of preformed liposomes with poor control of the density of attachment of HA,^{19,21,26} our method permitted introduction of the desired amount and variation of the density of hyaluronic acid that is necessary for optimal efficiency of lipoplexes.

Liposomes containing or not the HA–DOPE conjugate were thus prepared and their physicochemical properties assessed. Size measurements as well as cryomicroscopy observations evidence a change in the organization of liposomes before and after lipoplex formation. Indeed, the addition of DNA to cationic liposomes, containing or not HA–DOPE, induced a reduction of the mean size and polydispersity index that probably results from the reorganization of liposomes. This reorganization was also confirmed by cryomicroscopy that showed upon addition of DNA to liposomes, a transformation of the vesicular structure into small homogeneous aggregates with a very

- (32) Picker, L. J.; De los Toyos, J.; Telen, M. J.; Haynes, B. F.; Butcher, E. C. Monoclonal antibodies against the CD44 [In(Lu)-related p80], and Pgp-1 antigens in man recognize the Hermes class of lymphocyte homing receptors. *J. Immunol.* **1989**, *142* (6), 2046–51.
- (33) Li, L.; Heldin, C. H.; Heldin, P. Inhibition of platelet-derived growth factor-BB-induced receptor activation and fibroblast migration by hyaluronan activation of CD44. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (36), 26512–9.

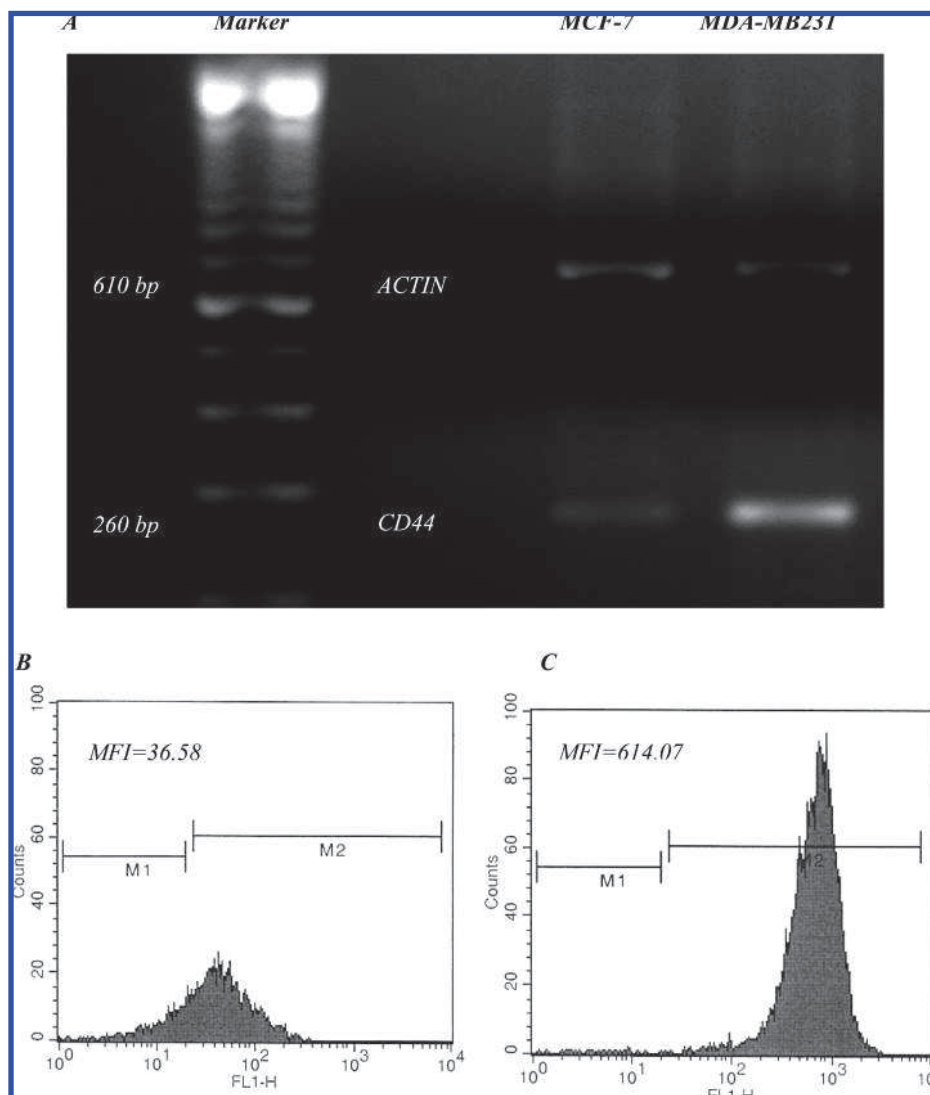


Figure 3. CD44s expression in MCF-7 and MDA-MB231 determined by RT-PCR (A). Expression of actin mRNA was used as control, and PCR products were loaded and separated on a 2% agarose gel or by fluorescence activated cell sorting. MCF-7 (B) or MDA-MB231 (C) cells were stained with CD44-labeled FITC antibody. FL1-H: fluorescence channel 1 height. MFI: median fluorescence intensity.

dense core. The formation of such aggregates was shown to result from a simultaneous rearrangement of the associated lipid via fusion of the cationic liposomes and DNA collapse.³⁴ It is thus interesting to note that the addition of HA-DOPE does not prevent this rearrangement. It was however evidenced that the addition of HA-DOPE led to a decrease of the total charge of cationic liposomes demonstrating that HA is mostly present on vesicle surface, partly shielding the positive charge of the cationic liposomes. This effect can be attributed to the carboxylic negative residues of HA. Moreover when adding DNA to these liposomes, a complete reorganization of charge repartition appears. Indeed, DNA turned the

system into negatively charged particles. Moreover, the zeta potential of such particles decreases proportionally to the density of HA-DOPE. The negative charge of lipoplexes with or without HA-DOPE might be attributed to a particular organization in which a lipid core is surrounded by DNA protruding at the surface.^{35,36} The presence of high MW HA at lipoplexes surface also contributes to shield their positive charge. However, despite being present at the surface, DNA was shown to be significantly protected from degradation against DNase I probably because the high MW HA and cationic lipids prevent access of DNase I to the whole colloidal system. Indeed, lipoplex DNA content analysis after DNase I

(34) Gershon, H.; Ghirlando, R.; Guttman, S. B.; Minsky, A. Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry* **1993**, *32* (28), 7143–51.

(35) Eastman, S. J.; Siegel, C.; Tousignant, J.; Smith, A. E.; Cheng, S. H.; Scheule, R. K. Biophysical characterization of cationic lipid: DNA complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1325* (1), 41–62.

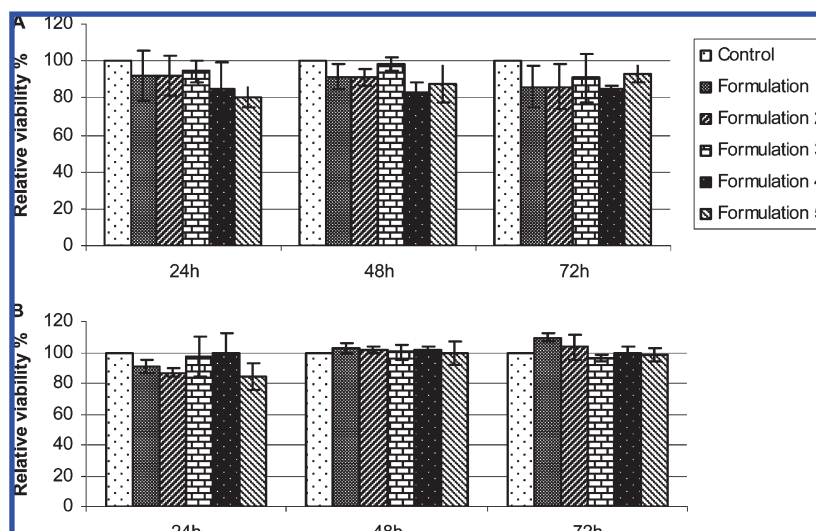


Figure 4. Cell viability of MCF-7 (A) and MDA-MB 231(B) in the presence of lipoplexes. Cells were treated with lipoplexes at a concentration of $7.5 \mu\text{g/mL}$ ($5 \mu\text{g}$ of lipid: $2.5 \mu\text{g}$ of DNA), and cytotoxicity of preparations containing and not containing the conjugate HA–DOPE (1, 2, 3, 4 and 5) was evaluated through MTS assay after 24, 48, and 72 h.

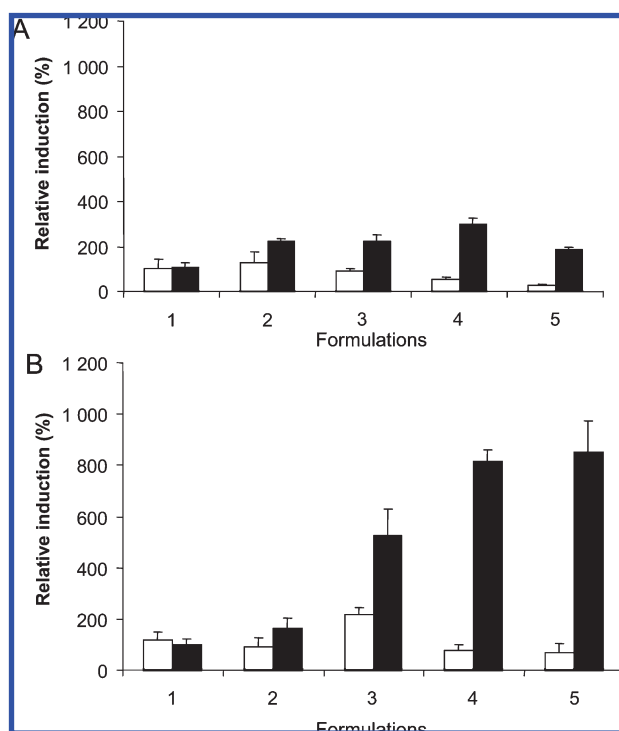


Figure 5. Comparative transfection efficiency in MCF-7 (A) and MDA-MB231 (B) cells treated with lipoplexes containing increasing amounts of HA (white) and lipoplexes containing increasing amounts of the HA–DOPE conjugate (black). (1) DE:DOPE lipoplexes. 2–5 refer to preparations containing either HA or HA–DOPE in different amounts: (2) 0.01 mg/mL of lipid; (3) 0.04 mg/mL of lipid; (4) 0.10 mg/mL of lipid; (5) 0.15 mg/mL of lipid.

digestion show a higher efficient protection of the DNA in the presence than in the absence of HA.

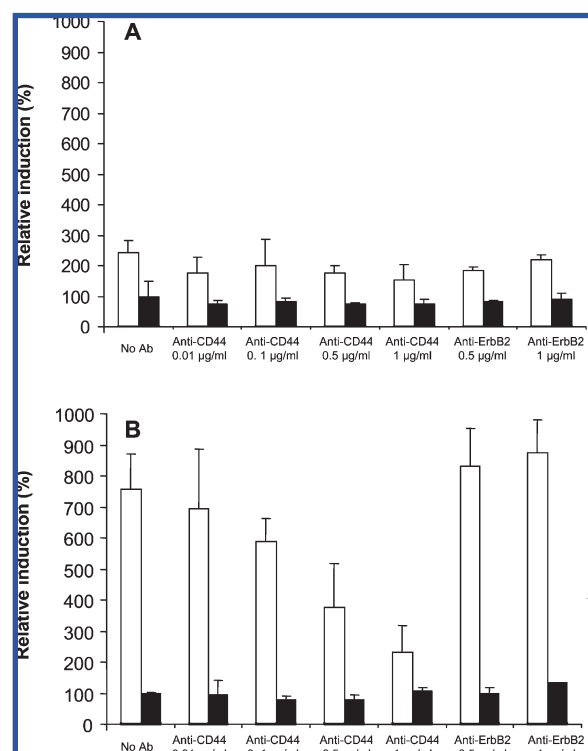


Figure 6. Comparative transfection efficiency in MCF-7 (A) and MDA-MB231 (B) cells treated with DE:DOPE lipoplexes (black) and lipoplexes containing 0.10 mg/mL of HA–DOPE conjugate (white) in the presence of increasing amounts of anti-CD44 antibody Hermes-1 and anti-ErbB2 antibody used as control.

Transfection efficiency was evaluated on both MCF-7 and MDA-MB-231 cells. It was impossible to obtain any trace of the presence of CD44 receptors on MCF-7 cells using Western blot (data not shown) confirming previous

observations.³⁷ However, RT-PCR, Q PCR and FACS revealed that CD44 was expressed in both cell lines although at a much higher extent on MDA-MB-231 cells. On both cell lines, lipoplexes containing or not the HA–DOPE conjugate display a similar low toxicity profile mainly because in all cases the carriers were negatively charged by contrast to other observations describing a high toxicity of cationic lipoplexes.³⁸ This might be the reason why more charge shielding provided by HA does not reduce more the cytotoxicity of lipoplexes. Moreover, in previous experiments, the DE used in cationic liposome formulation to deliver decoy oligonucleotides to macrophages displayed a much lower toxicity than Lipofectamine.³⁹ The reduced toxicity is therefore the combination of both a lipid with a low toxicity and the negative charge of lipoplex formulations. Using a pCMV luciferase plasmid, we have evaluated the potentiality of HA containing lipoplexes to increase transfection of CD44 rich breast cancer cells. Transfection of MDA-MB-231 cells was clearly increased when increasing the amount of conjugate until reaching saturation. A similar profile, but to a lower extent, was observed on MCF-7 cells. The mechanism involved in the augmentation of transfection efficiency was related on one hand to the presence of HA attached on the liposome surface and on the other hand to a large amount of CD44 receptors. The mechanism of transfection involves CD44 recognition, and this explains why negatively charged lipoplexes known to be currently less efficient for transfection, display in the present case around 7-fold increased transfection efficacy compared to plain lipoplexes. As a matter of fact, the positive charge of lipoplexes is important for binding to the cell surface by electrostatic interactions. The cationic complexes were shown to bind to glycosaminoglycans on the cell surfaces by electrostatic interactions.^{40,41} This type of interaction

becomes unnecessary in the present case, the transfection being only due to interactions between HA and the CD44 receptor. A study by Lesley and co-workers⁴² demonstrated that cooperativity is the primary feature of HA binding by cell surface CD44. This cooperativity is the result of multiple binding sites on the repeating disaccharide ligand and multiple closely arrayed receptors on the cell surface. The ligand factor shown to be relevant is the length of the carbohydrate chain, which determines the number of physically connected binding sites. The longer the sugar chain, the more linked binding sites are present, thus reducing the probability of the HA polymer dissociating from the cell surface.⁴² This is the reason why as expected, since MCF-7 was found to express a low amount of the receptors, transfection on this cell line was found to only slightly increase by the addition of HA. Indeed, hyaluronan binding properties characteristic of cells expressing CD44 requires threshold levels of receptor expression and hyaluronan of high molecular mass.^{43,44} However, it was established recently that MCF-7 cell line possesses a subpopulation of CD44 positive cells which does not represent more than 1% of the entire population.⁴⁵ Importantly, this CD44 positive subpopulation in MCF-7 cells, as well as in other breast cell lines such as T47D and in tumors from patients, is thought to be responsible for metastasis. Thus it is conceivable that our HA-targeted lipoplex could serve as an efficient vehicle for bringing genes of interest into dysfunctioning cells.

To validate the specific uptake of lipoplexes through the CD44 receptor, cells were incubated in presence of an anti-CD44 antibody (Hermes-1) that was shown to bind specifically to the CD44 receptor.³² Introducing increasing amounts of Hermes-1 in the culture medium decreased the transfection of MDA-MB-231 cells by 70% compared to untreated cells, and that was not the case of the nonspecific anti-ErbB2 antibody. As expected there was a reduction of transfection only with lipoplexes containing the HA–DOPE conjugate while plain lipoplexes induced similar transfection level in the presence or not of the anti-CD44 antibody (Hermes-1). Other evidence for CD44 mediated uptake of lipoplexes was demonstrated by (i) the poor transfection inhibition induced by anti-CD44 antibody (Hermes-1) on MCF-7 due to the poor level of receptor expression and (ii) by the poor transfection efficiency when free HA is associated physically with plain lipoplexes providing the

- (36) Ishiwata, H.; Suzuki, N.; Ando, S.; Kikuchi, H.; Kitagawa, T. Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes. *J. Controlled Release* **2000**, *69* (1), 139–48.
- (37) Draffin, J. E.; McFarlane, S.; Hill, A.; Johnston, P. G.; Waugh, D. J. CD44 potentiates the adherence of metastatic prostate and breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Cancer Res.* **2004**, *64* (16), 5702–11.
- (38) Song, L. Y.; Ahkong, Q. F.; Rong, Q.; Wang, Z.; Ansell, S.; Hope, M. J.; Mui, B. Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1558* (1), 1–13.
- (39) De Rosa, G.; De Stefano, D.; Laguardia, V.; Arpicco, S.; Simeon, V.; Carnuccio, R.; Fattal, E. Novel cationic liposome formulation for the delivery of an oligonucleotide decoy to NF-kappaB into activated macrophages. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *70* (1), 7–18.
- (40) Mislick, K. A.; Baldeschwieler, J. D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93* (22), 12349–54.
- (41) Mounkes, L. C.; Zhong, W.; Cipres-Palacin, G.; Heath, T. D.; Debs, R. J. Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (40), 26164–70.

- (42) Lesley, J.; Hascall, V. C.; Tammi, M.; Hyman, R. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (35), 26967–75.
- (43) Lesley, J.; Hyman, R.; Kincade, P. W. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv. Immunol.* **1993**, *54*, 271–335.
- (44) Perschl, A.; Lesley, J.; English, N.; Trowbridge, I.; Hyman, R. Role of CD44 cytoplasmic domain in hyaluronan binding. *Eur. J. Immunol.* **1995**, *25* (2), 495–501.
- (45) Harrell, J. C.; Dye, W. W.; Allred, D. C.; Jedlicka, P.; Spoelstra, N. S.; Sartorius, C. A.; Horwitz, K. B. Estrogen receptor positive breast cancer metastasis: altered hormonal sensitivity and tumor aggressiveness in lymphatic vessels and lymph nodes. *Cancer Res.* **2006**, *66* (18), 9308–15.

necessity of HA to be linked to DOPE on the surface of lipoplexes in order to see their uptake.

Conclusion

In conclusion, this is the first attempt to modify lipoplexes for targeting the CD44 receptor on cancer cell lines. We were able to demonstrate that a HA–DOPE conjugate can anchor on cationic liposomes surface without changing the complexation properties of the lipids and without affecting the protection of lipoplexes against DNA enzymatic degradation. Moreover, when CD44 is highly present on cell surface, a significant increase of transfection occurs, demonstrating the potentialities of targeting such a receptor for gene delivery.

Acknowledgment. The authors acknowledge financial support of Galenos Network, Galenos Fellowship in the Framework of the EU Project “Towards a European PhD in Advanced Drug Delivery”, Marie Curie Contract MEST-CT-2004-404992. The monoclonal antibody was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. The authors would like to acknowledge Monica Reid for manuscript revision.

MP800215D

Chapitre 1

Application à un plasmide modèle

Un conjugué d'HA de haut poids moléculaire et de lipide DOPE, nommé HA-DOPE a été précédemment synthétisé dans notre laboratoire (Surace *et al.*, 2009). Il a été inclus dans des lipoplexes et a démontré une amélioration de transfection de cellules de cancer du sein (Cf. préambule aux travaux expérimentaux). Le but du travail présenté dans ce chapitre a été de préciser la formulation des lipoplexes, de montrer l'association de l'HA aux lipoplexes, et d'effectuer des caractérisations physicochimiques plus approfondies, puis de comprendre les mécanismes d'endocytose. Ces analyses ont été effectuées grâce à l'utilisation d'un plasmide modèle GFP, ce qui permet grâce à la fluorescence émise par la protéine codée par ce dernier, une quantification efficace des taux de transfection. Ce travail a été soumis pour publication dans « *Journal of Controlled Release* ».

Des liposomes cationiques de DE:DOPE (1:1) conjugués à l'HA ont été complexés selon différents rapports lipides:ADN avec le plasmide GFP. Le diamètre, le potentiel zêta, la stabilité des lipoplexes et la protection vis-à-vis des nucléases ont été étudiés. Les rapports lipides:ADN 2, 4 et 6 présentent un diamètre autour de 250 nm avec un potentiel zêta d'environ -30 mV. La stabilité des interactions lipides:ADN et la fraction d'ADN protégée des dégradations enzymatiques, croît avec l'augmentation du rapport lipides:ADN. La faible capacité d'activer la fraction C3 du système du complément de ces trois rapports, avec ou sans HA-DOPE, a été montrée par immunoélectrophorèse 2D. L'efficacité de transfection en présence de 0, 10 et 15% d'HA, conjugué ou non aux lipoplexes, a été mesurée sur la lignée cellulaire de cancer pulmonaire A549 exprimant CD44 par cytométrie de flux. Le rapport lipides:ADN de 2 contenant 10% d'HA conjugué a été le plus efficace en transfection. Le niveau maximal d'expression de la GFP a été obtenu après 6 heures d'incubation démontrant une cinétique d'internalisation lente pour les lipoplexes. Enfin, la capture des lipoplexes, mesurée par cytométrie de flux et microscopie à fluorescence semble être dépendante du récepteur CD44 et des cavéoles.

Hyaluronic acid-bearing lipoplexes: physico-chemical characterization and in vitro targeting of the CD44 receptor

Amélie Dufaÿ Wojcicki^{1,2}, Hervé Hillaireau^{1,2}, Silvia Arpicco³, Myriam Taverna^{1,2}, Sandy Ribes^{1,4}, Christine Vauthier^{1,2}, Nicolas Tsapis^{1,2}, Elias Fattal^{1,2,*}

¹ Univ Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 5, rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

² CNRS UMR 8612, 5, rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France*

³ Università degli Studi di Torino, Facoltà di Farmacia, Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Via Pietro Giuria 9, 10125 Torino, Italy

⁴ EA4123, 5, rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

*Corresponding author:

Elias Fattal, Ph.D.

Université de Paris Sud 11

UMR CNRS 8612

Physico-chimie - Pharmacotechnie - Biopharmacie

Faculté de Pharmacie

5 rue JB Clément

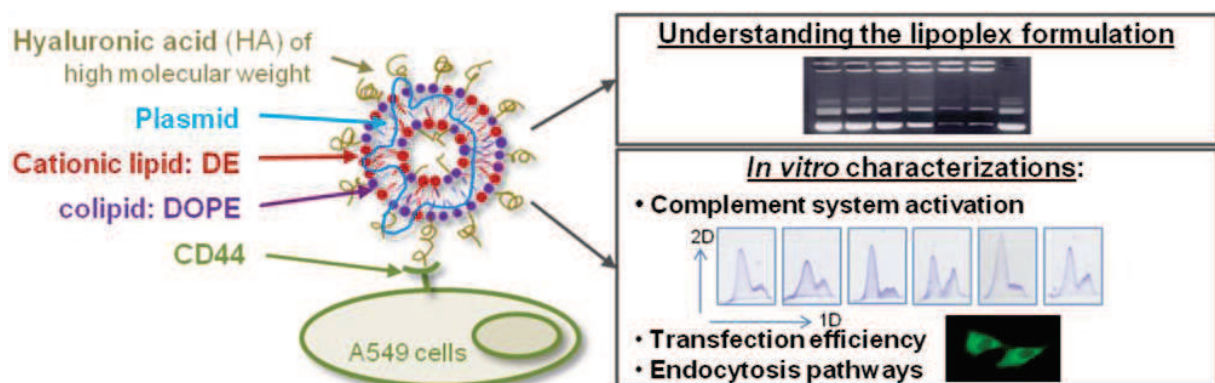
F-92296 Châtenay-Malabry

France

E-mail : elias.fattal@u-psud.fr

Fax: 33 146835946

Graphical abstract



Abstract

The mechanism by which hyaluronic acid (HA)-bearing lipoplexes target the A549 lung cancer cell line was evaluated. For this purpose, cationic liposomes targeting the CD44 receptor were designed thanks to the incorporation in their composition of a conjugate between high molecular weight HA and the lipid DOPE (HA-DOPE). Liposomes containing HA-DOPE were complexed at different lipids:DNA ratios with a reporter plasmid encoding the green fluorescent protein (GFP). Diameter, zeta potential, lipoplex stability and DNA protection from nucleases have been determined. Lipids:DNA ratios of 2, 4 and 6 provided a diameter around 250 nm with a zeta potential of -30 mV. The strength of lipids:DNA interaction and the fraction of DNA protected from enzymatic degradation increased with the lipids:DNA ratio. 2D-immunoelectrophoresis demonstrated the low capacity to activate the C3 fraction of the complement system of any of these three ratios, with and without HA-DOPE. Transfection efficiency in the presence of 0, 10 and 15% of HA-DOPE or unconjugated HA, was determined on the CD44-expressing A549 cells by flow cytometry. Lipoplexes at a lipids:DNA ratio of 2 containing 10% (w/w) of HA-DOPE were the most efficient for transfection. The maximal level of GFP expression was obtained after 6 hours of incubation demonstrating a slow transfection kinetics of lipoplexes. Finally, lipoplex cellular uptake, measured indirectly by the level of transfection using flow cytometry and validated by fluorescence microscopy, was shown to be mediated by the CD44 receptor and caveolae. These results demonstrate the strong specificity of DNA targeting through the CD44 receptor using HA of high molecular weight as a ligand.

Keywords: lipoplexes; hyaluronic acid ; A549 ; CD44 ; endocytosis ; complement activation

I. Introduction

Designing non viral gene delivery systems has been over the two last decades an important research area aiming to improve both stability and efficiency of the delivered plasmid DNA (Tros de Ilarduya *et al.*, 2010). Development of carriers mediating safe and efficient gene transfer has been required to reach therapeutic levels of protein expression. In such context, synthetic vectors have emerged as an attractive strategy as they are able to protect DNA from nuclease degradation and to induce its condensation therefore reducing its size and making their cell uptake possible. Among the non-viral gene delivery systems, cationic liposomes have been widely investigated. Their main advantages include low immunogenicity (Liu *et al.*, 1995) and toxicity (Stewart *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1993) as compared to viral vectors (Yang *et al.*, 1994; Knowles *et al.*, 1995) and their potential to transfect diverse tissues and cell types (Zhu *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1994; Knowles *et al.*, 1995; Thierry *et al.*, 1995). Nevertheless, several observations have limited the use in clinics of cationic lipid delivery systems. At first, it was observed *in vivo* in animal models that they aggregate in serum and therefore, accumulate in organs of the mononuclear phagocyte system (MPS), being taken up by macrophages (Mahato *et al.*, 1995). When covering lipoplexes by polyethyleneglycol (PEG) to reduce opsonisation and MPS uptake, a decrease of transfection efficiency was observed *in vitro* (Bally *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2002). Moreover, it was shown that the use of PEG combined with liposomal formulations containing DNA makes them less efficient *in vitro* [9] and more immunogenic (Semple *et al.*, 2005).

Hyaluronic acid (HA) is a glycosaminoglycan composed of non-esterified disaccharidic units of *N*-acetylglucosamine and glucuronic acid chains alternately $\beta 1 \rightarrow 4$ and $\beta 1 \rightarrow 3$. It is the major component of the extracellular matrix, being therefore ubiquitous. Contrary to HA oligomers, the native high molecular weight HA does not induce expression of genes involved in proliferation or inflammation (Noble 2002) and counteracts proangiogenic effects of the oligomers (Deed *et al.*, 1997). Even if native HA can activate some signaling pathways, this occurs at levels far lower than with HA oligomers (Noble 2002). All this has led to consider the high molecular weight HA as a "bioinert" component (Pardue *et al.*, 2008). Most interestingly, HA was proposed as an alternative to PEG, to target liposomes encapsulating small molecules (Peer *et al.*, 2004; Peer *et al.*, 2004) or lipoplexes (Surace *et al.*, 2009). HA presents two advantages. First it can be an addressing molecule due to the expression of its membrane receptor, CD44, on tumor initiating cells (TIC) (Al-Hajj *et al.*, 2003) and second

because it is a hydrophilic polymer, it could prevent opsonin adsorption by steric repulsion allowing to reduce MPS uptake.

We have synthesized a HA-DOPE conjugate which was included in lipoplexes demonstrating an improved transfection of breast cancer cells (Surace *et al.*, 2009). These first results have demonstrated that using HA was indeed relevant for increasing the expression of a reporter gene in a cancer cell line. However, the extent of HA anchoring to lipoplexes and the mechanism of uptake remained open questions. The present report aims to produce the evidence of the presence of HA on lipoplex surface and clarify their mechanism of internalization through their interaction with the CD44 receptor on the A549 lung cancer cell line.

II. Materials and methods

A. Materials

High molecular weight hyaluronic acid (HA) (sodium salt, 1600 kDa, purity of 95%) was purchased from Acros organics (Geel, Belgium). L-alpha-dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) was provided by Avanti Polar Lipids distributed by Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). The cationic lipid [2-(2-3didodecyloxypropyl)hydroxyethyl]ammonium bromide (DE) was synthesized as described (Arpicco *et al.*, 2004). Research grade plasmid pCMV-GFP pF463 (3487 bp) was purchased from Plasmid factory (Bielefeld, Germany).

B. Lipoplex preparation

To prepare liposomes, a thin lipid film was obtained by evaporation under vacuum of a chloroformic solution of an equal mixture (w/w) of DE and DOPE using a rotative evaporator. The lipid film was then hydrated with an aqueous solution of 10% (w/v) HA-DOPE conjugate at a final concentration of 1 mg/mL during 8 min under vortex stirring until complete film detachment and formation of a liposomal suspension. Various volumes of liposomal suspension were gently added to a 1 mg/mL pCMV-GFP solution at different lipids:DNA ratios. Complexation under nitrogen, at ambient temperature, was carried out during at least 1 h before use.

C. Differential scanning calorimetry

Differential Scanning Calorimetry (DSC) analysis was performed on hydrated samples using a differential scanning calorimeter (DSC 7, Perkin Elmer, USA) equipped with the Pyris software. 12 h before the experiment, lipid films of DOPE (10 mg) were hydrated either with 100 μ L MilliQ water or with 100 μ L of a 10 mg/mL HA-DOPE solution. Then about 4 mg of accurately weighted samples were introduced into a 40 μ L pan and analyzed. DSC runs were conducted from -40°C to $+90^{\circ}\text{C}$ at a rate of $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Calibration was achieved using n-decane ($T_m = -28.11^{\circ}\text{C}$) as well as indium ($T_m = 156.83^{\circ}\text{C}$). Enthalpies were normalized with respect to DOPE weight in the sample.

D. Capillary electrophoresis

A Beckman P/ACE System 5500 was used with an uncoated fused silica capillary (length to detector: 57 cm and internal diameter: 75 μm) on normal polarity. Electrophoresis conditions to analyse HA-DOPE conjugate were derived from Grimshaw *et al.* for the assay of HA (Grimshaw *et al.*, 1996). The capillary was first conditioned by 4 successive rinsings for 5 min each with water, 1 M NaOH, 0.1 M NaOH and back to water. Then before each analysis, the capillary was washed with successively (and at 20 psi), water for 1 min, 0.1 M NaOH for 2 min, water for 1 min, 0.1 M HCl for 2 min, water for 2 min and finally equilibrated with the background electrolyte for 2 min. The separation buffer was 40 mM sodium tetraborate containing 40 mM of sodium dodecyl sulfate (SDS). Sample injection was done under nitrogen at 0.5 psi for 2 secondes. All samples were adjusted at a concentration of 0.5 mg/mL of HA or HA-DOPE by evaporation under vacuum using an Eppendorf Concentrator® at 30°C , which concentrated liposomes 5-fold and lipoplexes 8-fold. This step was validated after verification by dynamic light scattering that no modification of the diameter and zeta potential occurred during this concentration step (data not shown). Detection wavelength was 200 nm and the voltage applied was 18 kV. The capillary was maintained at 25°C during electrophoresis. Experiments were performed at least in duplicate.

E. Diameter and zeta potential measurement

Diameter and zeta potential were determined with a Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). Before each measurement, liposomes and lipoplexes were diluted at 2% in 1 mM NaCl. Measurements were carried out in triplicate at 25°C on three independent preparations.

F. Gel migration assay

After addition of BB5X blue (10 mM Tris pH 7.4, 2 mM EDTA, 25% glycerol, 0.02% bromophenol blue, and 0.02% xylene cyanol), 2 µg of plasmid, free or complexed to liposomes at different lipids:DNA ratios (1, 2, 3, 4, 6, 8) were loaded on an 1% agarose gel in TBE1X buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA disodium salt) containing ethidium bromide, and migrated at 100 V for 20 min. DNA which was not bound to liposomes migrated under electric field.

G. Protection against degradation by nucleases

2 µg of plasmid complexed or not to liposomes at different lipids:DNA ratios (1, 2, 3, 4, 6, 8) were digested by 2 IU of DNase I (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for 30 min at 37°C in the presence of 20 mM MgCl₂. The digestion was stopped by heating the mixture at 60°C for 10 min in the presence of 50 mM EDTA. Lipids were then solubilized in a SDS solution up to a final detergent concentration of 17 mM. After vigorous agitation, samples were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min then heated at 75°C for 15 min. Each sample was loaded on an 1% agarose gel in TBE 1X as described for gel migration assay.

H. Complement activation

Conversion of plasmatic C3 protein into C3b and C3a fragments, signing an activation of the complement system, was evaluated by 2-D immunoelectrophoresis using a polyclonal antibody to human C3 as described (Diaz-Lopez *et al.*, 2010). Lipoplexes of lipids:DNA ratios of 2, 4 and 6 with or without HA-DOPE were prepared, then concentrated 10-fold at 30°C using an Eppendorf Concentrator® in order to obtain a sufficient specific surface. Veronal Buffer Saline (VBS) containing 0.15 mM Ca²⁺ and 0.5 mM Mg²⁺ ions (VBS²⁺) and VBS containing 40 mM ethylenediaminetetraacetic acid (VBS-EDTA) were prepared as described by Kazatchkine *et al.* (Kazatchkine *et al.*, 1986). A volume of suspension equivalent to a specific surface of 230 cm² (calculated by $S_{\text{specific}} = \frac{6 \times m}{D \times d}$ where D is the average diameter, m is the mass contained in the sample, and d is the density) was incubated under gentle agitation for 1 h at 37°C with 50 µL of human serum and 50 µL of VBS²⁺. The absence of lipoplex size modification in this medium was checked. Briefly, samples were subjected to a first electrophoresis on 1% agarose gel in tricine buffer, then deposited on a Gelbond® film coated with agarose gel containing a polyclonal antibody to human C3 (Sigma, France) at

0.1 mg/mL. They were then subjected to a second dimension electrophoresis, followed by protein precipitation and fixation in 0.15 M NaCl and further drying. Films were finally stained with coomassie blue to reveal the presence of inactive C3, and lower active fragments C3a and C3b precipitated with the antibody. Each sample was analyzed three times across the whole process. Complement activation was expressed as the complement activation factor (CAF) defined as the ratio of the peak surface of C3a + C3b detected on the plate over the sum of the peaks surface of C3 and C3a + b, using the following equation: $CAF = \frac{(C3a+C3b)}{C3+(C3a+C3b)}$. Areas under the peaks were measured using the ImageJ software.

I. Cell culture

Human lung cancer A549 cells (ATCC CCL-185) were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 (Lonza, Belgium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Lonza, Belgium), 50 U.mL⁻¹ penicillin, 50 U.mL⁻¹ streptomycin and 1% glutamine. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

J. Assessment of CD44 expression

A549 samples for assessment of CD44 expression were prepared as described before (Surace *et al.*, 2009). For all flow cytometry experiments, cells were excited at 488 nm with an argon laser source, and emission was analyzed through a 510/20 nm band-pass filter for GFP, a 529/28 nm band-pass filter for FITC. Doublets were eliminated by pulse discrimination. The cytometer was a MoFlo XDP (Beckman Coulter) driven by the Summit software. Analysis was done in duplicate with 10,000 cells measured in each sample. Results are given as a percentage of cells above fluorescence threshold.

K. Cell transfection

Cells were seeded in 500 µL of growth medium (7.5×10^4 cells.mL⁻¹) in 24-well plates (TPP, Switzerland) and pre-incubated for 24 h. Just before treatment, by various lipoplexes formulations (lipids:DNA ratios of 2, 4 and 6; without or with 10 and 15% of HA-DOPE or unconjugated HA) for 24 h at 10 µg/mL, cells were washed and recovered with medium without serum. Lipofectin®, a formulation of DOTMA:DOPE (1:1), was used as a positive control. Cells were washed and medium with FBS was introduced 24 h after transfection. To study the transfection kinetics, medium was removed 2, 6 or 24 h after the beginning of the

treatment by lipoplexes of ratio 2 with 10% HA-DOPE. Medium containing FBS was put 24 h after transfection. Samples were prepared 54 h after transfection for flow cytometry experiments. After detachment, cells were washed by PBS and then recovered in 600 μ L of 1% paraformaldehyde in PBS at 4°C. Analyses were achieved by flow cytometry as described for assessment of CD44 expression. 5,000 cells were measured per sample and each was done in triplicate. The normalized transfection efficacy index (NTEI) was calculated according to the following equation:

$$\text{NTEI} = \% \text{ of singulet living cells which express GFP} \times \frac{\text{fluorescence intensity of GFP}^+ \text{ cells}}{\text{fluorescence intensity of GFP}^- \text{ cells}}$$

Moreover, results of kinetics study expressed in NTEI are also presented in percentage, taking into account that the value of NTEI at 24 h is fixed at 100%.

L. Endocytosis pathways

A549 cells were pretreated with aqueous solutions of 1 μ M chlorpromazine, high molecular weight HA in 50 fold the amount contained in lipoplexes 10% HA, 1.6 μ g/mL CD44 antibody (clone A3D8), 50 μ M genistein, 1 μ M filipin (Sigma Aldrich, France) (a control experiment was performed including the same volume of ethanol than what is contained in filipin solution). After 1 h of incubation at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ (except 2 h for CD44 antibody), lipoplexes of ratio 2 with 10% HA-DOPE were added (10 μ g/mL). Medium was removed after 6 h. Medium containing FBS was added 24 h after transfection. Samples for flow cytometry analysis were prepared as previously described for study of cell transfection 54 h after transfection. Results expressed in NTEI are presented in percentage, taking as reference for 100%, the NTEI of control without inhibitory treatment. These studies were coupled with fluorescence microscopy. *In vitro* imaging acquisition was performed with a Zeiss videomicroscope (Axio Observer Z1) equipped with an incubator (temperature and CO₂ controlled) in order to collect the green fluorescence on living cells. All images were acquired with a 20X/0.8 plan-Apochromat objective lens using a 470 nm LED for excitation and a 505-550 nm band pass filter to collect the emission of fluorescence. Videomicroscope was coupled with a MRm CCD camera.

III. Results

A. Characterization of HA-DOPE lipoplexes

The physico-chemical studies were aimed to evaluate the presence of the conjugate within liposome structure. Differential scanning calorimetry analysis of DOPE demonstrates that the endotherm of gel to liquid crystal phase transition shifted from -10.30°C with water or unconjugated HA to -8.97°C with HA-DOPE (Supplementary Figure S1). Assessment of the HA-DOPE purity and determination of the HA fraction bound to liposomes or lipoplexes were carried out by capillary electrophoresis by determination of the free fraction of HA (Fig. 1).

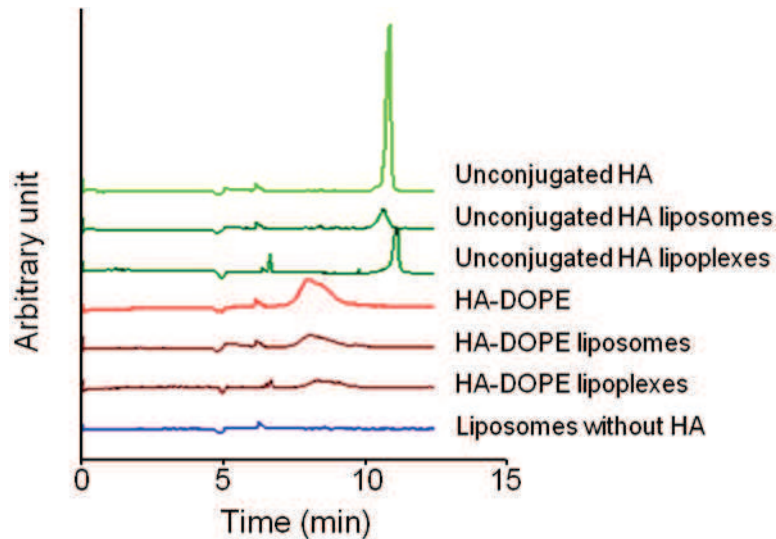


Figure 1: Electropherogramms obtained by capillary electrophoresis of 0.5 mg/mL unconjugated HA , 0.5mg/mL HA-DOPE, liposomes with unconjugated HA or HA-DOPE or without any HA, lipoplexes with unconjugated HA or HA-DOPE.

HA-DOPE migration time was 9 min and the electrophoretic profile did not display the characteristic peak of unconjugated HA which appears at 12 min demonstrating the absence of free HA in the conjugate. $80 \pm 3.1\%$ of unconjugated HA is bound to liposomes, but after DNA addition only $17 \pm 1.3\%$ remains associated to them. However in the case of HA-DOPE, only $61 \pm 1.0\%$ of HA-DOPE is associated to liposomes, but $42 \pm 10.7\%$ remains associated after lipoplex formation. Whereas the liposome diameter was similar at around 400 nm with or without HA, significant reduction of the zeta potential was observed when liposomes are associated to 10% of HA-DOPE or unconjugated HA compared to plain liposomes ($p < 0.0001$) (Fig. 2).

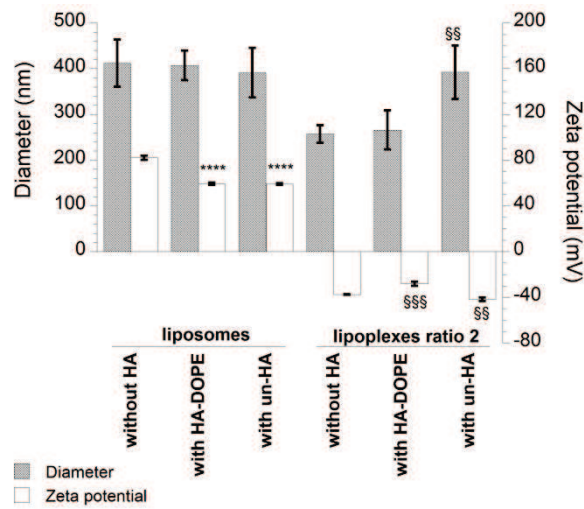


Figure 2: Diameters and zeta potentials of liposomes, compared to lipoplexes at a lipids:DNA ratio of 2 containing or not 10% HA-DOPE or unconjugated HA (un-HA) (vs. liposomes without HA: **** $p < 0.0001$; vs. lipoplexes without HA: §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$) (n = 3).

Addition of DNA to liposomes decreased their diameter in the same way for lipoplexes formulations without HA or with 10% HA-DOPE, but not for lipoplexes with 10% unconjugated HA. Presence of DNA lowers zeta potential values to around -30 mV. Finally, the diameter and zeta potential values were similar between lipids:DNA ratios varying from 1 to 6 in presence of HA-DOPE, being around 300 nm and -30 mV (Fig. 3).

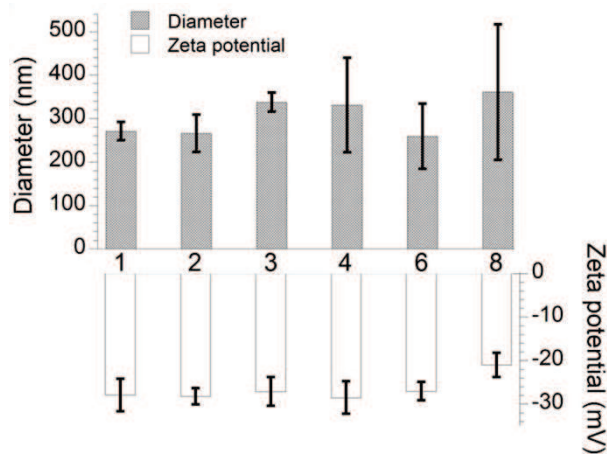


Figure 3: Diameters and zeta potentials of lipoplexes at different lipids:DNA ratios (1, 2, 3, 4, 6, 8) (n = 3 on 3 independent preparations).

For the highest lipids:DNA ratio tested, 8, the diameter and the zeta potential increased respectively to values of 361 ± 156 nm and -21.0 ± 2.7 mV.

B. DNA stability and DNA-liposome interactions

Assessment of the interaction between DNA and liposomes was carried out by electrophoresis on agarose gel (Fig. 4).

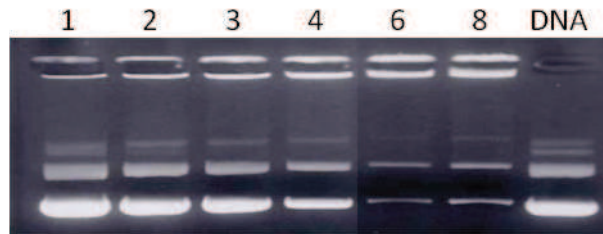


Figure 4: 1% agarose gel showing profile migration of plasmid in lipoplexes at different lipids:DNA ratios (1, 2, 3, 4, 6, 8) with 10% HA-DOPE, at a constant amount of DNA, and comparison with free DNA. The non migrating plasmid is on the top of the gel image. DNA bands on the bottom are the fraction of DNA that can be separated from the lipoplexes by electrophoresis.

DNA migration shows that when the lipids:DNA ratio increased, the associated fraction increased and the quantity of free or weakly associated fractions was reduced. A similar experiment was carried out after incubation of lipoplexes with DNase I (Fig. 5).

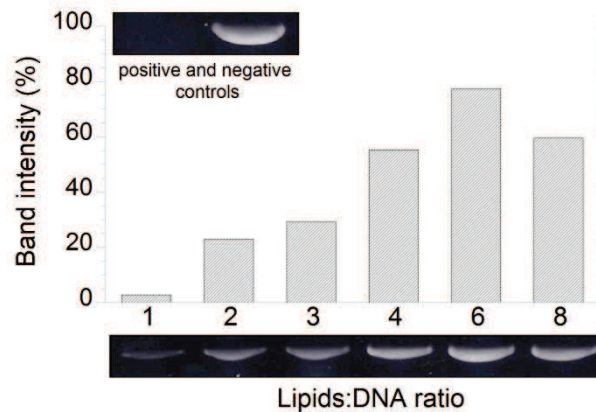


Figure 5: 1% agarose gel showing migration profile of plasmid in lipoplexes for different lipids:DNA ratios (1, 2, 3, 4, 6, 8) with 10% HA-DOPE at constant amount of DNA after DNase I exposition (in unit sufficient to total digestion as shown by positive control). Histograms present band intensity determined thanks to ImageJ software (% compared to the negative control set at 100%).

This experiment demonstrates that the more the cationic lipids, the better the protection against DNase I is. Indeed protection increased from 3% to 77% with lipids:DNA ratios varying respectively from 1 to 6. The protection effect then decreased slightly, being 60% for a lipids:DNA ratio of 8.

C. Complement activation

Complement activation was determined by 2D-immunoelectrophoresis of C3 on lipoplexes made with three lipids:DNA ratios of 2, 4, 6 with or without 10% of HA-DOPE (Fig. 6).

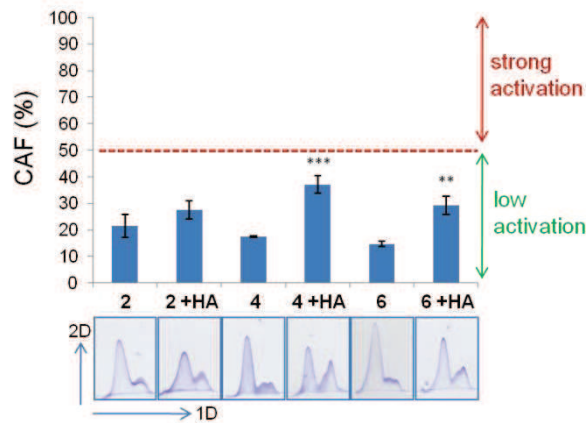


Figure 6: Complement activation factor (CAF) values for lipoplexes at lipids:DNA ratios of 2, 4, 6, with or without 10% of HA-DOPE, after subtraction of the CAF value corresponding to spontaneous activation of serum (100% matches for CAF value of positive controls at the specific area of 230 cm²) (with HA-DOPE vs without HA-DOPE: ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$).**

Although lipoplexes containing HA-DOPE with lipids:DNA ratios of 4 and 6 give higher CAF values than the respective samples without HA-DOPE, all formulations tested possess CAF values under 50%, which corresponds to a low activation of the complement (incubation time of 1 h, a specific surface value of 230 cm²).

D. Transfection of CD44-expressing A549 cells

As seen by flow cytometry, 99.98 % of A549 cells express CD44 on their surface (Supplementary Figure S2). Cell viability measured by MTT was always above 80% for concentration of lipoplexes up to 10 µg/mL in culture medium, independently of lipids:DNA ratio and whether HA-DOPE was present or not in the formulation (data not shown). After 2 and 6 h of incubation with lipoplexes, the NTEI reached respectively 50 and 100% of the maximal level equivalent to the one obtained with 24 h of incubation (Supplementary Figure S3). Comparison of different lipids:DNA ratios shows that, despite an equivalent amount of intact DNA, the lipids:DNA ratios of 2 and 4 are more effective than 6 (Fig. 7).

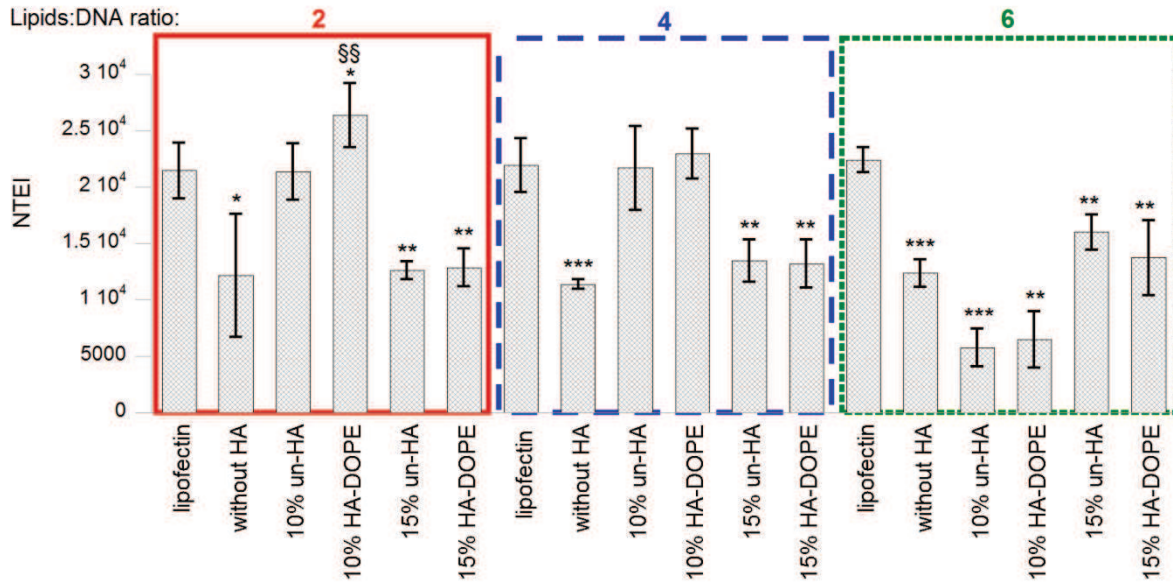


Figure 7: Normalized transfection efficacy index (NTEI) of lipoplexes, as a function of the lipids:DNA ratio (2, 4, 6), the mode (conjugated or unconjugated) and the rate (0, 10 or 15%) of HA incorporation, and comparison with Lipofectin® at the same lipids:DNA ratios (2, 4, 6) (vs Lipofectin® at same ratio: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; vs unconjugated HA at same ratio: §§ $p < 0.01$; $n = 3$).

For these two more efficient ratios, the addition of 10% HA-DOPE, but not 15%, increased significantly the GFP expression. Lipids:DNA ratio of 4 containing 10% HA-DOPE and unconjugated HA present the same GFP expression levels as Lipofectin®. For the ratio 2 containing 10% of HA, a larger transfection efficiency was observed compared to other treatment and particularly compared to unconjugated HA ($p < 0.01$) and Lipofectin® ($p < 0.05$).

E. Determination of endocytosis pathways

Cell treatment with HA 50X, which saturates CD44, or CD44 antibody which blocks the HA receptor, both resulted in a 40% decrease of GFP expression (Fig. 8).

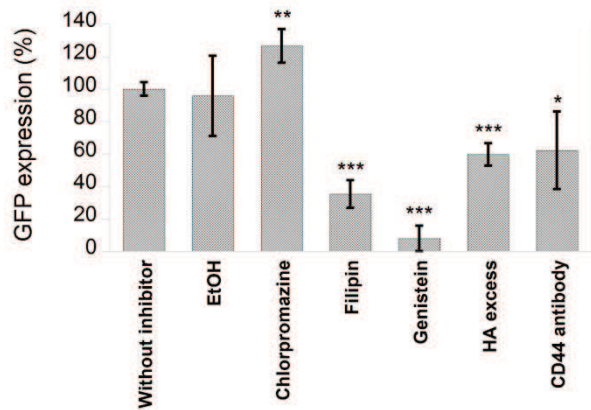


Figure 8: Effects of endocytosis-interfering treatments on GFP expression studied by flow cytometry. A549 were incubated for 6 h with lipoplexes with a lipids:DNA ratio of 2 containing 10% of HA-DOPE, 1 h (except 2 h for CD44 antibody) after pretreatment with 1 μ M chlorpromazine, 1 μ M filipin (+ control ethanol alone), 50 μ M genistein, excess of high molecular weight HA (50X), and 10 μ g/mL CD44 antibody. NTEI results are expressed in percentage with NTEI of control cells set at 100% (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; n = 3).

Incubation with filipin, an inhibitor of caveolae-mediated endocytosis, reduces the transfection by 60%. Moreover, when genistein, another inhibitor of this internalization pathway, is used, GFP expression is lowered by 90%. In contrast, using chlorpromazine, a clathrin-mediated endocytosis inhibitor, transfection levels were not changed. Microscopy experiments enable to verify visually the cell integrity (no dysmorphism or autofluorescent dead cells) and coincide with flow cytometry results (Supplementary Figure S4).

IV. Discussion

The present report was aiming to understand the mechanism of interaction of HA-bearing lipoplexes with CD44 receptor-expressing cells. The first underlying basic assumption of our study was that HA-DOPE conjugate could be inserted into vesicle bilayers thanks to its hydrophobic moiety. The HA-DOPE conjugate is obtained through the creation of an amidic bond between the carboxylic group of HA and the amino group of DOPE. However, the affinity between the conjugate and lipids forming the liposome bilayer was questionable regarding the large difference of molecular weight existing between DOPE (740 g.mol^{-1}) and HA ($1.6 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$). Differential scanning calorimetry revealed a difference of behavior between unconjugated HA and HA conjugated to DOPE suggesting that DOPE covalently linked to HA interacts with DOPE, being therefore able to play the role of anchor in the lipid membrane.

Previous studies by Surace et al. (Surace *et al.*, 2009) have shown that 10% HA-DOPE (w/w) was optimal for transfection of MDA-MB231 breast cancer cells expressing CD44. We have therefore used this amount of conjugate and formulated lipoplexes at different lipids:DNA ratios. Whereas all lipoplex formulations were negatively charged, a reduction of the zeta potential was only seen for the highest lipids:DNA ratio of 8. Nevertheless, at these lipids:DNA ratios, the size distribution was polydisperse. It was shown previously that lipoplex size and heterogeneity of the structures both appear to increase along with the lipids:DNA ratio probably because the density of the complexes decreases as the lipids:DNA ratio increases (Eastman *et al.*, 1997). Nevertheless, estimation of lipoplex stability by gel migration reveals that the more lipids were introduced to a constant amount of DNA, the stronger the interactions in lipoplexes. At lowest lipids:DNA ratios, the low amount of cationic charges left a large part of DNA free from any interaction. However, capillary electrophoresis shows that there is no migration of free DNA at a ratio of 2 (no peak at 32 min as control DNA alone, data not shown). At high lipids:DNA ratios of 6 or 8, the amount of free DNA was low meaning that all charges from DNA are involved in the interaction with cationic liposomes. These data are of high interest since even with a high amount of cationic lipids, the particles remain negatively charged. Cationic charges are known to promote strong instabilities in the presence of serum leading to aggregation (Zelphati *et al.*, 1998). This phenomena would disappear in presence of the lipoplexes designed here. Finally, as the amount of cationic lipids increases, an increase of the protection ability against DNase I is observed with a maximum of protection close to 80% for a lipids:DNA ratio of 6. This

protection then decreases at the ratio of 8 where the density of the lipoplexes is supposed to be lower (as shown by size measurements), allowing more access to the degrading enzymes. In relation to these data, the lipoplex formulations of ratios 2, 4 and 6 were considered as the most promising for further experiments.

We have determined whether HA could modulate complement activation when added in the formulations. Despite an increase of complement activation for the ratios 4 and 6 formulated with HA-DOPE compared to lipoplexes formulated without the conjugate, all formulations are low activators of the complement system, the formulation prepared at a lipids:DNA ratio of 2 being the less activating one. These data are in accordance with those of Mizrahy et al. reporting that unilamellar liposomes of 100 nm, containing 1500 kDa HA and composed of PC:Chol:DPPE slightly enhance complement activation (Mizrahy et al., 2011). This slight increase of complement activation in the presence of HA-DOPE could be due to polysaccharidic nature of HA, even if it is the lowest activator of glycosaminoglycans (Chang et al., 1986). Another explanation could involve the way HA-DOPE is inserted in the lipid bilayer. Because more than one DOPE is linked on one chain of HA, the conjugate insertion could be obtained by more than one anchor, inducing the formation of a specific conformation of the HA around the lipoplexes which might be different from the classic brush or mushroom. In any case, our goal to obtain lipoplexes with a low activating profile was reached. This is further supported by observations by Plank et al. (Plank et al., 1996) showing the low complement activation potential of the cationic lipids used. Finally, it is noteworthy that the lipoplex surface area used in this experiment was more than four times higher than what could be present after administration in vivo in a mouse model.

Transfection experiments were carried out on the A549 cancer cell line, which was shown in our hands to be a suitable model for targeting DNA because the totality of the cell population exhibits the CD44 membrane receptor (Taetz *et al.*, 2009). Transfection efficiency of lipoplexes at different lipids:DNA ratios was tested at equivalent amount of intact DNA and using GFP plasmid as reporter gene. The optimal lipoplex formulation was the one containing 10% HA-DOPE at a lipids:DNA ratio of 2, which displayed a higher efficiency than lipoplexes without HA-DOPE, lipoplexes associated to unconjugated HA, and Lipofectin®. Moreover, when increasing the amount of HA-DOPE conjugate from 10 to 15%, the GFP expression dropped down to levels obtained with lipoplexes made without HA-DOPE. At this concentration, the amount of HA presented to cell might be too high to allow interaction with the CD44 receptor because of steric hindrance. These observations are supported by mechanistic studies demonstrating that when saturating CD44 receptor by an excess of HA or

the CD44 epitope deadlock by antibody treatment, a strong reduction of GFP expression was observed. This also confirms the crucial role of the receptor in the endocytosis mediated process, as shown previously by us and others (Mizrahy *et al.*, 2011; Qhattal *et al.*, 2011).

The more efficient formulation obtained at a lipids:DNA ratio of 2 with an amount of 10% HA was further characterized. Capillary electrophoresis was first used to indirectly quantify the amount of HA bound to the vesicles in the unconjugated form or conjugated to DOPE. The determination of the free fraction of HA compared to the total amount of HA added in formulations of ratio 2 shows that HA-DOPE binds to a lower extent to liposomes but strongly to lipoplexes as compared to liposomes/lipoplexes prepared with unconjugated HA. The use of HA-DOPE conjugate provides twice more association of HA to lipoplexes which could also explain the highest transfection efficiency of HA-DOPE containing lipoplexes. The presence of the anionic HA (conjugated or unconjugated) at the surface of cationic liposomes lowers the zeta potential values, demonstrating surface coverage. This external location is a prerequisite to confer cell specific targeting. We observed drastic size reduction when adding DNA to plain liposomes or liposomes containing HA-DOPE from values of around 400 nm down to 250 nm. Surprisingly, size reduction could not be observed with unconjugated HA. DNA that is negatively charged competes more efficiently with free negatively charged HA that is bound only electrostatically to cationic liposomes. Whereas when HA is associated to lipid bilayer through its DOPE moiety insertion, competition between HA and DNA is lower: HA-DOPE does not interfere with lipoplex formation since it interacts mainly with liposomes by hydrophobic forces. Moreover, unconjugated HA inhibits lipoplex formation since HA is added before DNA in the process of lipoplex formation. This might explain why zeta potential values are more negative with lipoplexes containing unconjugated HA than with those containing HA-DOPE.

The endocytosis pathways were finally explored by different endocytosis-interfering treatments. There was no inhibitory effect of chlorpromazine, a cationic amphiphilic drug, which causes the loss of coated pits from the surface of the cell and blocks the appearance of clathrin coats on endosomal membranes (Wang *et al.*, 1993). This excludes clathrin-mediated endocytosis from being the pathway considered for the internalization of HA-DOPE-bearing lipoplexes. Since the perturbation of the caveolae, that is rich in cholesterol, by filipin, a sterol binding agent or by genistein, a kinase inhibitor (Schnitzer *et al.*, 1994) induces a decrease of the GFP expression in A549 cells, caveolae appear as the main endocytosis pathway of HA-bearing lipoplexes. Moreover, when CD44 is neutralized, transfection is also lowered suggesting that this receptor plays a role in lipoplex uptake. Caveolin-mediated endocytosis

was already shown to be activated in the case of HA interaction with CD44 (Long *et al.*, 2012), both caveolin (Hooper 1999) and CD44 (Ponta *et al.*, 2003) being present in lipid rafts domains. Inhibition of CD44 by an excess of HA or CD44 antibody are known to block one of the pathways for caveolin phosphorylation which is necessary to start the caveolae-dependent endocytosis (Long *et al.*, 2012). The reason why filipin and genistein are able to decrease in a larger manner the transfection level might be due to a higher inhibition of the caveolae-dependent endocytosis by cholesterol sequestration or perturbation of both dynamin and actin networks respectively, contrary to the inhibition of CD44 that impacts only a part of the caveolae process activation. Use of methylbetacyclodextrin in order to extract cholesterol was not possible as we observe cell dysmorphology and conclude to too much cytotoxicity on A549 whatever the concentration used. In A549 cells, clathrin-mediated endocytosis gives maximal levels of gene expression after an incubation period of 15 min, while maximal levels are being attained after 3h for caveolae pathway (Rejman *et al.*, 2005). The slow kinetics of GFP expression that we observed were typical for a caveolae-mediated internalization (Rejman *et al.*, 2005). This caveolae mediated endocytosis is consistent with the internalization pathway of DMRIE:cholesterol (1:1) lipoplexes (Wong *et al.*, 2007), but not with DOTAP lipoplexes that are internalized in A549 mainly by clathrin-mediated endocytosis (Rejman *et al.*, 2005). Moreover our results are in accordance with others that show the ability of HA-bearing liposomes to interact with cells expressing CD44 (Mizrahy *et al.*, 2011; Qhattal *et al.*, 2011).

V. Conclusion

Among the different ratios tested, one formulation has notably emerged from transfection screening: lipoplexes prepared at a lipids:DNA ratio of 2 containing 10% HA-DOPE. This HA-DOPE incorporation rate leads to the most efficient formulation while maintaining a low complement activation. Here we provide additional information showing the interest of lipoplexes containing an HA-DOPE conjugate, which confers affinity to HA and allows a lipid bilayer insertion. Secondly, HA-DOPE is of interest because of the higher amount of HA associated to lipoplexes. And finally, this conjugate improves the transfection efficiency obtained after internalization that could be mediated by the CD44 receptor. This last point confers an ability of being internalized by cells expressing the CD44 membrane receptor, which may have a high potential to target tumor-initiating cells.

Acknowledgments

This work has benefited from the facilities and expertise of the Imagif Cell Biology Unit of the Gif campus (www.imagif.cnrs.fr) which is supported by the Conseil Général de l'Essonne. We would like to acknowledge Valérie Nicolas (IFR IPSIT, Univ Paris-Sud) for microscopy experiments and Marie Sophie Noël-Hudson for useful advice.

References

- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-3988.
- Arpicco S, Canevari S, Ceruti M, Galmozzi E, Rocco F and Cattel L (2004). "Synthesis, characterization and transfection activity of new saturated and unsaturated cationic lipids." Farmaco **59**(11): 869-878.
- Bally MB, Harvie P, Wong FM, Kong S, Wasan EK and Reimer DL (1999). "Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers." Adv Drug Deliv Rev **38**(3): 291-315.
- Chang NS and Boackle RJ (1986). "Glycosaminoglycans enhance complement hemolytic efficiency: theoretical considerations for GAG-complement-saliva interactions." Mol Immunol **23**(8): 887-893.
- Deed R, Rooney P, Kumar P, Norton JD, Smith J, Freemont AJ and Kumar S (1997). "Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan." Int J Cancer **71**(2): 251-256.
- Diaz-Lopez R, Tsapis N, Santin M, Bridal S, Nicolas V, Jaillard D, Libong D, Chaminade P, Marsaud V, Vauthier C and Fattal E (2010). "The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent." Biomaterials: 1723-1731.
- Eastman SJ, Siegel C, Tousignant J, Smith AE, Cheng SH and Scheule RK (1997). "Biophysical characterization of cationic lipid: DNA complexes." Biochim Biophys Acta **1325**(1): 41-62.
- Grimshaw J, Trocha-Grimshaw J, Fisher W, Rice A, Smith S, Spedding P, Duffy J and Mollan R (1996). "Quantitative analysis of hyaluronan in human synovial fluid using capillary electrophoresis." Electrophoresis **17**(2): 396-400.
- Hooper NM (1999). "Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (Review)." Molecular Membrane Biology **16**(2): 145-156.
- Kazatchkine M, Hauptmann G and Nydegger U (1986). Techniques du complément. Paris, INSERM.
- Knowles MR, Hohneker KW, Zhou Z, Olsen JC, Noah TL, Hu PC, Leigh MW, Engelhardt JF, Edwards LJ, Jones KR, Grossman M, Wilson JM, Johnson LG and Boucher RC (1995). "A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." N Engl J Med **333**(13): 823-831.
- Liu Y, Liggitt D, Zhong W, Tu G, Gaensler K and Debs R (1995). "Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery." J Biol Chem **270**(42): 24864-24870.

Long M, Huang S-H, Wu C-H, Shackelford G and Jong A (2012). "Lipid raft/caveolae signaling is required for *Cryptococcus neoformans* invasion into human brain microvascular endothelial cells." Journal of Biomedical Science **19**(1): 19.

Mahato RI, Kawabata K, Nomura T, Takakura Y and Hashida M (1995). "Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of plasmid DNA/cationic liposome complexes." J Pharm Sci **84**(11): 1267-1271.

Mizrahy S, Raz SR, Hasgaard M, Liu H, Soffer-Tsur N, Cohen K, Dvash R, Landsman-Milo D, Bremer MGEG, Moghimi SM and Peer D (2011). "Hyaluronan-coated nanoparticles: The influence of the molecular weight on CD44-hyaluronan interactions and on the immune response." Journal of Controlled Release **156**(2): 231-238.

Noble PW (2002). "Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair." Matrix Biol **21**(1): 25-29.

Pardue EL, Ibrahim S and Ramamurthi A (2008). "Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering." Organogenesis **4**(4): 203-214.

Peer D and Margalit R (2004). "Loading mitomycin C inside long circulating hyaluronan targeted nano-liposomes increases its antitumor activity in three mice tumor models." Int J Cancer **108**(5): 780-789.

Peer D and Margalit R (2004). "Tumor-targeted hyaluronan nanoliposomes increase the antitumor activity of liposomal Doxorubicin in syngeneic and human xenograft mouse tumor models." Neoplasia **6**(4): 343-353.

Plank C, Mechtler K, Szoka FC, 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**(12): 1437-1446.

Ponta H, Sherman L and Herrlich PA (2003). "CD44: from adhesion molecules to signalling regulators." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(1): 33-45.

Qhattal HSS and Liu X (2011). "Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes." Molecular Pharmaceutics **8**(4): 1233-1246.

Rejman J, Bragonzi A and Conese M (2005). "Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes." Mol Ther **12**(3): 468-474.

Schnitzer JE, Oh P, Pinney E and Allard J (1994). "Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules." J Cell Biol **127**(5): 1217-1232.

Semple SC, Harasym TO, Clow KA, Ansell SM, Klimuk SK and Hope MJ (2005). "Immunogenicity and rapid blood clearance of liposomes containing polyethylene glycol-lipid conjugates and nucleic Acid." J Pharmacol Exp Ther **312**(3): 1020-1026.

Shi F, Wasungu L, Nomden A, Stuart MC, Polushkin E, Engberts JB and Hoekstra D (2002). "Interference of poly(ethylene glycol)-lipid analogues with cationic-lipid-mediated delivery of oligonucleotides; role of lipid exchangeability and non-lamellar transitions." Biochem J **366**(Pt 1): 333-341.

Stewart MJ, Plautz GE, Del Buono L, Yang ZY, Xu L, Gao X, Huang L, Nabel EG and Nabel GJ (1992). "Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: safety and acute toxicity in mice." Hum Gene Ther **3**(3): 267-275.

Surace C, Arpicco S, Dufay-Wojcicki A, Marsaud V, Bouclier C, Clay D, Cattel L, Renoir JM and Fattal E (2009). "Lipoplexes Targeting the CD44 Hyaluronic Acid Receptor for Efficient Transfection of Breast Cancer Cells." Molecular Pharmaceutics **6**(4): 1062-1073.

Taetz S, Bochot A, Surace C, Arpicco S, Renoir JM, Schaefer UF, Marsaud V, Kerdine-Roemer S, Lehr CM and Fattal E (2009). "Hyaluronic Acid-Modified DOTAP/DOPE Liposomes for the Targeted Delivery of Anti-Telomerase siRNA to CD44-Expressing Lung Cancer Cells." Oligonucleotides **19**(2): 103-115.

Thierry AR, Lunardi-Iskandar Y, Bryant JL, Rabinovich P, Gallo RC and Mahan LC (1995). "Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9742-9746.

Tros de Ilarduya C, Sun Y and Düzgüneş N (2010). "Gene delivery by lipoplexes and polyplexes." European Journal of Pharmaceutical Sciences **40**(3): 159-170.

Wang LH, Rothberg KG and Anderson RG (1993). "Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation." J Cell Biol **123**(5): 1107-1117.

Wong AW, Scales SJ and Reilly DE (2007). "DNA internalized via caveolae requires microtubule-dependent, Rab7-independent transport to the late endocytic pathway for delivery to the nucleus." J Biol Chem **282**(31): 22953-22963.

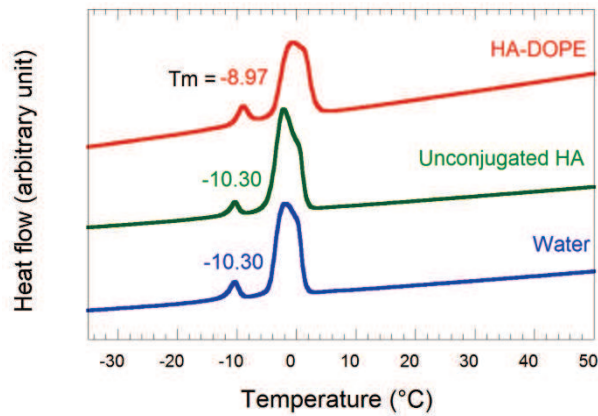
Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E and Wilson JM (1994). "Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4407-4411.

Zelphati O, Uyechi LS, Barron LG and Szoka FC, Jr. (1998). "Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells." Biochim Biophys Acta **1390**(2): 119-133.

Zhu N, Liggitt D, Liu Y and Debs R (1993). "Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice." Science **261**(5118): 209-211.

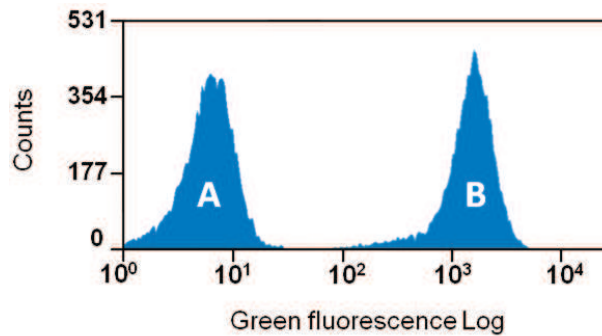
Supplementary data

Figure S1



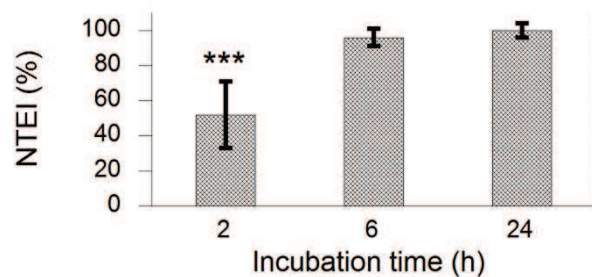
Study of the transition temperature from gel to liquid crystalline phase of DOPE hydrated by different solutions (HA-DOPE, unconjugated HA and water) by differential scanning calorimetry. The first peak of each thermogram corresponds to the transition temperature (T_m) of hydrated DOPE and the second to the water melting. The three curves corresponds (from top to bottom) to DOPE film hydrated by an aqueous solution of HA-DOPE 10%, DOPE film hydrated by an aqueous solution of unconjugated HA 10% and to DOPE film hydrated by water.

Figure S2



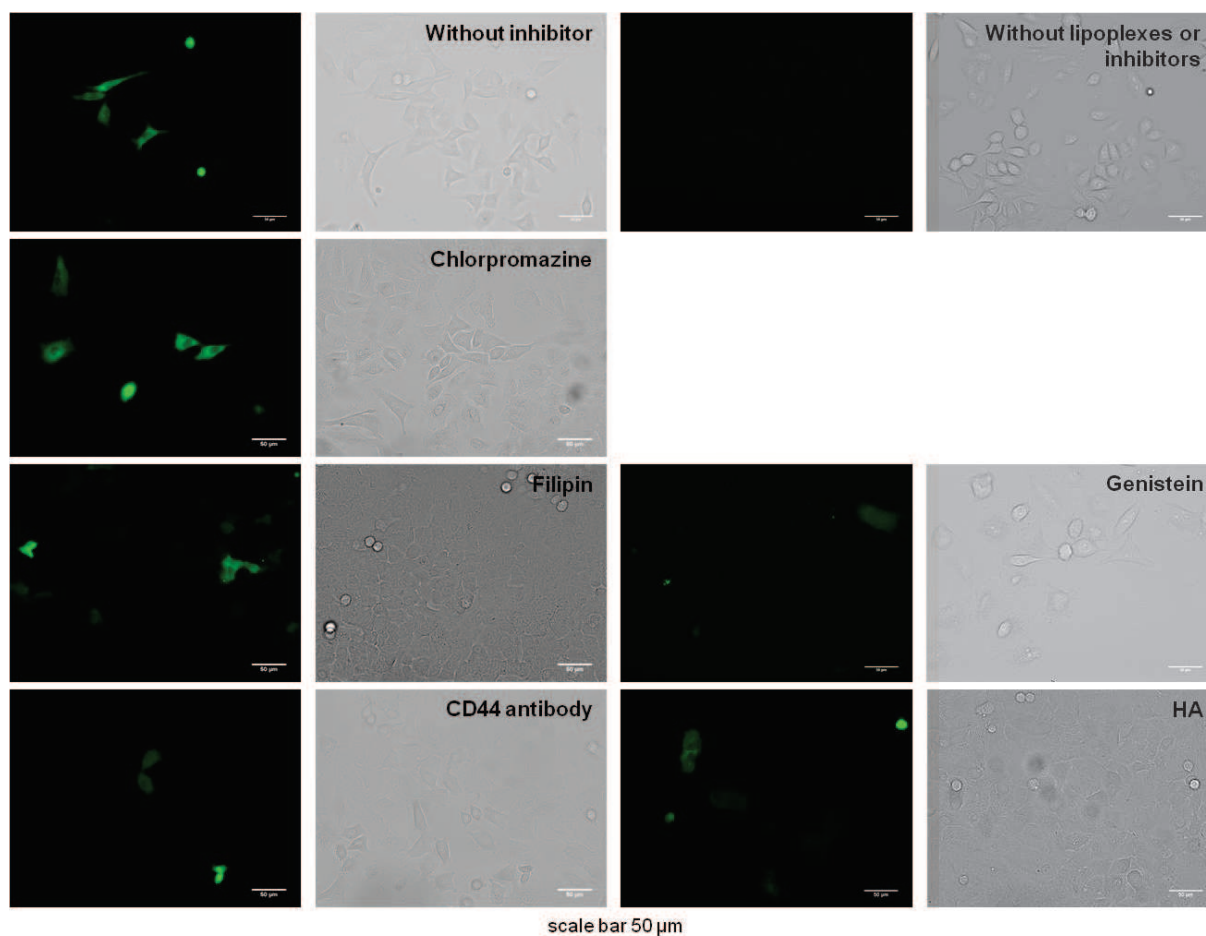
A549 were stained with IgG1-labeled FITC antibody (A) and CD44-labeled FITC antibody (B). Each sample was measured in duplicate (10,000 cells measured per aliquot).

Figure S3



A549 transfection kinetics of ratio lipids:DNA 2 containing 10% of HA-DOPE incubated for 2, 6 or 24 h. Flow cytometry results of normalized transfection efficacy index (NTEI) are expressed as a percentage of the NTEI reached at 24h (***) ($p < 0.001$; $n = 3$).

Figure S4



Fluorescence and bright field images of A549 cells all treated by lipoplexes at lipids:DNA ratios of 2 containing 10% HA-DOPE (except negative control called “without lipoplexes or inhibitors”), after different endocytosis-interfering treatments: chlorpromazine, filipin, genistein, CD44 antibody, excess of HA.

Chapitre 2

Application à un plasmide d'intérêt thérapeutique

L'intérêt de conjuguer de l'HA à des lipoplexes a été démontré, tant en termes de pourcentage d'association et de non suppression de l'effet de complexation lors de l'ajout de l'ADN, qu'en termes d'efficacité de transfection *in vitro* sur une lignée cellulaire de cancer du poumon (chapitre 1), et sur des cellules de cancer du sein (Surace *et al.*, 2009) (Cf. préambule aux travaux expérimentaux). Les travaux expérimentaux présentés maintenant, ont pour but, d'approfondir les données déjà récoltées, mais cette fois grâce à l'utilisation d'un plasmide d'intérêt thérapeutique codant pour un potentiel suppresseur de tumeur. Mais surtout, après sélection du modèle cellulaire le plus adapté, ces travaux ont permis de tester notre stratégie de thérapie génique ciblée *in vivo*. Cette partie du travail a été dirigée par le Dr J. M. Renoir au sein de l'unité UMR CNRS 8612.

Les liposomes cationiques conjugués à l'HA ont été complexés selon deux rapports lipides:ADN au plasmide codant pour le récepteur des estrogènes β , ER β . Les valeurs de diamètre, de potentiel zêta, et de capacité de protection vis-à-vis des nucléases quantifiée par PCR sont comparables à celles obtenues dans le chapitre 1. La validation de la construction plasmidique, ainsi que la conservation de son activité après complexation aux liposomes cationiques a été vérifiée. Trois lignées cellulaires humaines de cancer du sein ont été caractérisées par PCR, western blot et FACS. La lignée MCF-7 IAL, meilleur compromis du point de vue de l'expression du récepteur membranaire CD44, ciblé par le vecteur et du récepteur des estrogènes ER α , ciblé par la protéine ER β codée au sein du plasmide vectorisé a été choisie comme modèle d'étude. L'évaluation de l'impact des lipoplexes sur la viabilité des cellules MCF-7 IAL, par test MTT, a permis de déterminer la concentration seuil de 10 $\mu\text{g/mL}$ de milieu de culture, permettant de maintenir plus de 80% de cellules viables. Les essais de transfection transitoire *in vitro*, ont montré une expression dépendante du temps d'incubation lipoplexes-cellules et une augmentation d'expression avec le rapport lipides:ADN 2:1. L'étude *in vivo* sur un modèle de xénogreffe à MCF-7 IAL chez la souris *nude* a été menée sur 6 semaines de traitement bihebdomadaire. L'évolution des courbes de croissance montre une diminution du volume tumoral uniquement pour le lot traité avec les lipoplexes de ER β conjugués à l'HA. Les analyses immunohistologiques sont en accord avec ces observations puisque l'indice de prolifération Ki67 régresse. L'absence d'HA-DOPE ou de la séquence codante pour la protéine d'intérêt thérapeutique ne réduisent ni le volume tumoral, ni le Ki67. Les lipoplexes conjugués à l'HA, permettent d'obtenir une biodistribution différente par voie sanguine et autorise un effet thérapeutique anticancéreux *in vivo*.

Vectorisation à l'aide de lipoplexes d'acide hyaluronique du gène ER β , potentiel suppresseur de tumeur dans les cancers du sein hormono-dépendants : caractérisation et activité anti-tumorale *in vivo*

I. Introduction

Dans les cancers du sein hormono-dépendants, la balance ER α /ER β représente le paramètre décisif d'orientation du mécanisme transcriptionnel de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Le récepteur ER α induit des effets mitogéniques en réponse à l'estradiol. L'isotype ER β est capable de réprimer les actions prolifératives de ER α . Dans le cas des cancers du sein estrogéno-dépendants exprimant ER α , le niveau d'expression de ce récepteur est très supérieur à celui de ER β . Depuis une dizaine d'années, de nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo* suggèrent un rôle de suppresseur de tumeur pour ER β et d'inhibiteur de la prolifération (Lazennec *et al.*, 2001; Paruthiyil *et al.*, 2004; Strom *et al.*, 2004; Hartman *et al.*, 2006; Lazennec 2006; Treeck *et al.*, 2009; Paruthiyil *et al.*, 2011). L'apport du gène codant pour ER β dans les cellules de tumeurs mammaires exprimant ER α , afin de contrecarrer les effets délétères de ce dernier (Hall *et al.*, 1999; Lindberg *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2006), apparait comme une stratégie thérapeutique prometteuse.

Cependant, comme évoqué précédemment, le transfert efficace du gène thérapeutique implique l'utilisation d'un agent de condensation et de protection efficace vis-à-vis des nucléases et d'une stratégie de vectorisation qui permet sa circulation prolongée dans le compartiment sanguin et autorise son extravasation au niveau du site tumoral, tout en assurant son activité. Afin d'améliorer les performances d'apport du gène, un adressage aux cellules tumorales est nécessaire pour éviter les effets néfastes sur les cellules saines et potentialiser les effets au niveau des cellules cancéreuses.

Le travail présenté dans la partie expérimentale de ce chapitre 2, constitue une stratégie de vectorisation ciblée de ER β par l'emploi de lipoplexes de DE:DOPE 1:1 fonctionnalisés par l'acide hyaluronique (HA), qui ont été conçus pour cibler les cellules tumorales d'un cancer primitif ou métastatique. En effet, l'HA, ligand du récepteur membranaire CD44, confère aux lipoplexes une affinité pour les cellules exprimant CD44. Or, CD44 est une cible stratégique dans le cancer du sein, puisqu'il est exprimé par le chef d'orchestre des cancers : les cellules souches cancéreuses (CSC) caractérisées par le phénotype CD24^{-faible} et CD44⁺ (Al-Hajj *et al.*,

2003). Sous stimulation estrogénique, CD24 est réprimé par ER α grâce à l'existence d'ERE (*estrogen response element*) sur son promoteur (Kaipparattu *et al.*, 2008) et CD44 est augmenté (Durst *et al.*, 2001).

Néanmoins, une étude sur plus de 240 tumeurs du sein humaines a montré que le phénotype CD44⁺/CD24⁻ est souvent retrouvé dans les cas ER négatifs, sans pour autant pouvoir établir une relation précise avec l'expression de ER (Honeth *et al.*, 2008). Cet élément est en défaveur de notre stratégie, car nous souhaitons faire exprimer ER β par des cellules exprimant ER α *via* le ciblage de CD44. Cependant, l'équipe de Wicha a proposé un modèle qui justifie cette stratégie (Dontu *et al.*, 2004). En effet, pendant le développement mammaire normal, les cellules souches s'auto-renouvellent et se différencient. Les cellules progénitrices primitives générées durant le développement fœtal, produisent des progéniteurs ER⁻. Les progéniteurs ER⁺ apparaissent au bout de 30 semaines de gestation, et répondent à la stimulation estrogénique par prolifération et génération de cellules épithéliales ductales et alvéolaires. La carcinogénèse est le résultat de mutations affectant différentes cellules progénitrices. Ainsi, les différents phénotypes de cancers du sein sont déterminés par le type de cellule ayant conduit à la carcinogénèse par mutation. Ainsi, les tumeurs ER⁻ proviennent de cellules souches ER⁻ (type 1), tandis que les tumeurs ER⁺ peuvent résulter soit de progéniteur ER⁻ (type 2) (qui se différencie ensuite en cellules ER⁻ et ER⁺), soit de progéniteur ER⁺ (type 3).

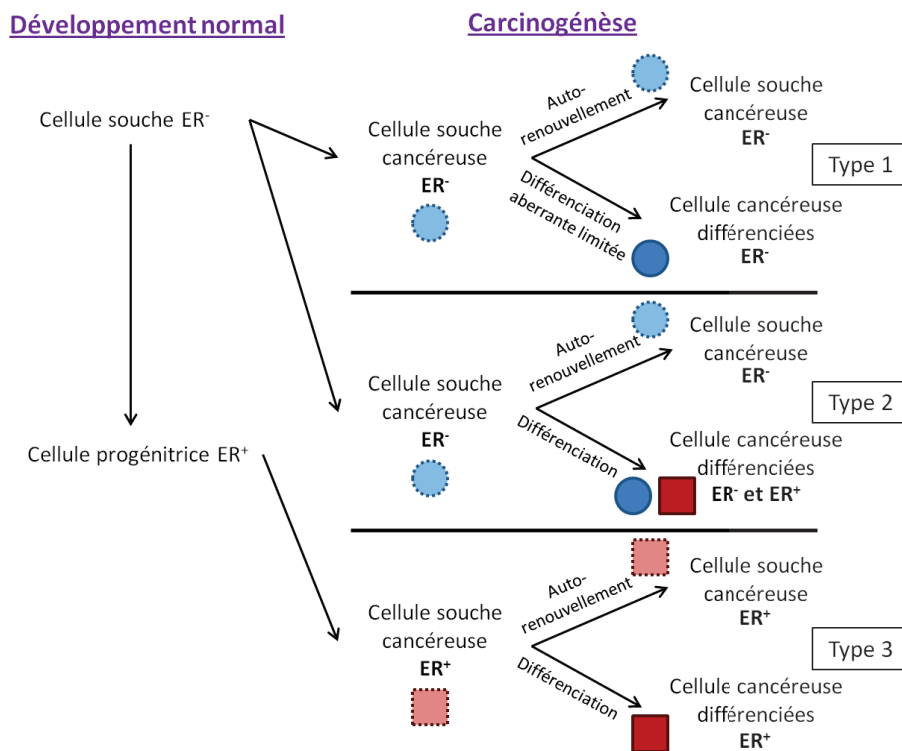


Figure 1 : Modèle proposé par (Dontu *et al.*, 2004) pour expliquer l'existence de cellules souches cancéreuses exprimant ER ou non.

L'apport du suppresseur de tumeur ER β , par le ciblage du récepteur membranaire CD44, est adapté à la carcinogénèse de type 3 du modèle proposé par l'équipe de Wicha. Notre rationnel semble donc potentiellement applicable dans un tiers des types de cancers du sein hormono-dépendants. Néanmoins, cette action partielle pharmacologique ne renseigne pas sur les volumes réels de cas/patients concernés par notre approche, mais indique que cette dernière trouvera sa place en tant que stratégie thérapeutique. Allant dans ce même sens, des analyses immunohistochimiques sur des tumeurs primaires issues de patients ont montré que 62 à 70% des tumeurs exprimant ER étaient également de phénotype identique au CSC de cancer du sein, à savoir CD44⁺ et CD24^{-/faible} (contre respectivement 38 à 30% ER⁻/CD44⁺/CD24^{-/faible}) (Ricardo *et al.*, 2011). Par ailleurs, Harrell *et al.* ont montré *in vivo*, sur des modèles de xénogreffes de MCF-7 et T47D, que CD44 est peu exprimé et de façon hétérogène dans la tumeur primaire. Au contraire, il est surexprimé dans les cellules cancéreuses présentes dans les vaisseaux lymphatiques (souvent sous forme d'embolies) et au niveau des métastases dans les ganglions lymphatiques. Ils suggèrent que la sous population CD44⁺ (c'est-à-dire exprimant CD44) de la tumeur primaire est préférentiellement conduite par les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux ganglions lymphatiques. Ils ont en outre constaté que le niveau d'expression de ER était souvent supérieur dans les ganglions lymphatiques par rapport à celui retrouvé dans la tumeur primaire (Harrell *et al.*, 2006). Ainsi, un ciblage thérapeutique de la sous population CD44⁺ pourrait prévenir l'apparition des métastases dans les ganglions lymphatiques. L'apport de ER β aux cellules exprimant CD44 devrait autoriser une expression sélective du potentiel suppresseur de tumeur par la sous population clé jouant un rôle dans la dynamique de progression tumorale et d'apparition des métastases.

Notre rationnel de départ s'appuie sur la théorie des CSC et sur l'aptitude de ER β à agir comme un suppresseur de tumeur. Notre objectif est de prouver, avec une lignée exprimant à la fois CD44 et ER α , que l'administration d'un vecteur de thérapie génique ciblant le récepteur CD44 et délivrant par voie intraveineuse un plasmide qui exprime ER β , peut conduire à la mise en place d'une activité antitumorale gouvernée par ER β .

II. Matériels et méthodes

A. Caractérisation des lignées humaines de cancer du sein : ER α , ER β , et CD44

La lignée de cancer du sein humain MCF-7 IAL (*Institut André Lwoff*) (MCF pour *Michigan Cancer Foundation*) a été gracieusement donnée par Annick Harel-Bellan, IFR 89, Institut

André Lwoff, Villejuif, France. La lignée MDA-MB231 (*M. D. Anderson-Metastatic Breast*) a été obtenue par ATCC (HTB-265). La lignée MCF-7 RU est un don de Roussel Uclaf. Ces trois lignées de cancer du sein humain ont été cultivées à 37°C, sous une atmosphère humide contenant 5% de CO₂, dans du milieu Eagle modifié par Dubelcco (DMEM) contenant 4,5 g/L de glucose, 10 % de sérum de veau fœtal (ou FCS pour *Fetal Calf Serum*), 2 mM de L-glutamine, 50 UI/mL de pénicilline et 50 UI/mL de streptomycine. Le rouge de phénol présent dans le DMEM contient des composés à activité oestrogénique pouvant interférer avec l'étude du récepteur β des estrogènes. Le FCS contient également des stéroïdes (10^{-11} M environ), ce qui est suffisant pour activer certaines voies de signalisation. C'est pourquoi, avant chaque expérimentation, les cellules ont été incubées 3 jours dans du milieu DMEM sans rouge de phénol et contenant du FCS privé des stéroïdes par traitement au charbon (1% Norit A, 0,1 % Dextran) pendant 30 min puis filtré à travers des pores de 0,2 μ m.

1. Recherche des transcrits ARNm par RT PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

a) Extraction des ARN

5. 10^6 cellules sont collectées dans des tubes de 15 mL après ajout de 8 mL de Trizol® (Life technologies), puis lysées pendant 5 min à température ambiante. Les tubes sont vigoureusement agités en présence de 1,6 mL de chloroforme puis centrifugés (10 min, 3000 g). La phase aqueuse est prélevée et les ARNs sont précipités pendant 30 min à l'aide de 4 mL d'isopropanol. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 3000 g pendant 20 min. Le culot d'ARN est lavé par 10 mL d'éthanol à 70%. Après une nouvelle centrifugation (3000 g, 10 min), le culot est séché et les ARN sont dissouts dans 100 μ L d'eau milliQ autoclavée. Les ARN totaux sont alors dosés par spectrophotométrie UV à 260 et 280 nm, après dilution de 3 μ L dans 500 μ L d'eau.

b) Réaction de transcription inverse

A 2 μ g d'ARN totaux (volume déterminé lors du dosage) sont ajoutés 5 μ L d'amorces aléatoires à 40 ng/ μ L, 1 μ L d'un mélange des quatre désoxyribonucléotides à une concentration de 10 mM, et de l'eau sans RNase en quantité suffisante pour un volume final de 12 μ L. Le mélange réactionnel est chauffé à 65°C pendant 5 min, de façon à linéariser l'ARN, puis figé dans la glace. 4 μ L de tampon de réaction « first Strand Buffer 5X » (Invitrogen), 2 μ L de DTT 0,1 M, 1 μ L de Rnase OUT (40 U/L, Invitrogen) et 1 μ L

d'enzyme M-MLVRT (200 U/ μ L, Invitrogen) sont ensuite ajoutés. Le mélange est incubé 10 min à 25°C, puis 50 min à 37°C et enfin 15 min à 70°C afin d'inactiver l'enzyme.

c) Réaction de polymérisation en chaîne ou PCR

Les couples d'oligonucléotides utilisés sont présentés dans le tableau suivant (figure 2) :

amorces	séquence 5' 3'	fragment attendu (pb)	Tm (°C)
β actine L	TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA	610	60
β actine R	CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG		
ER β -flag L	AAGGATGACGACGATAAGGCTA	313	62
ER β -flag R	GATAACTGGCGATGGACCAC		
ER β R	CGT AAC ACT TCC GAA GTC GG	346	60
ER β L	TCA CAT CTG TAT GCG GAA CC		
ER α L	AGA CAT GAG AGC TGC CAA CC	299	60
ER α R	GCC AGG CAC ATT CTA GAA GG		
CD44 R	CAA GAG GGA TGC CAA GAT GAT		62
CD44 L	GCA GCA CTT CAG GAG GTT ACA T		

Figure 2 : Présentation des différents couples d'amorces utilisés en PCR. L'abréviation Tm correspond à la température d'anneau (Eurogentec, Liège, Belgique).

Dans des tubes de PCR, à 2 μ L d'ADNc, sont ajoutés 25 μ L d'un mélange contenant 10 pmoles de chaque amorce, 2,5 μ L du tampon d'amplification (Invitrogen), 0,5 μ L d'un mélange des quatre nucléotides 10 mM, 0,75 μ L de MgCl₂, 1 UI de Taq polymérase Platinum (Invitrogen). Les contrôles sont constitués par 2 μ L d'eau (contrôle négatif) et par le plasmide correspondant (2 μ L à 50 ng/ μ L) à l'ARNm recherché lorsque celui-ci était disponible (contrôle positif). Les échantillons ont ensuite été amplifiés par 35 cycles de PCR. Chaque cycle comporte trois phases : une dénaturation d'1 min à 95°C, un anneau de 1 min (à une température spécifique aux amorces), puis une élongation de 1 min à 72°C. Enfin une dernière étape d'incubation à 72°C pendant 10 min permet de terminer toutes les élongations.

d) Analyse des produits de PCR par migration sur gel d'agarose

A chaque échantillon, sont ajoutés 3 μ L de tampon BB5X (Tris pH 7,4 10 mM, EDTA 2 mM, 25% de glycérol, 0,02% de bleu de bromophénol, et 0,02% de xylène cyanol). Les produits de PCR sont analysés par migration sur un gel d'agarose à 2% préparé dans du TBE 0,5X (Tris 0,56 M, acide borique 0,56 M et EDTA pH 8,3 40 mM) et contenant 500 μ g/mL de BET (bromure d'éthidium). Après environ 1 h30 de migration à 100 V dans du TBE 0,5X, l'ADN est visualisé sous lampe UV.

2. Expression protéique

a) Buvardage à l'occidental ou Western blot

Des culots cellulaires contenant $5 \cdot 10^6$ cellules sont repris dans du tampon de lyse de formule Hépès 50 mM pH 7,5/ NaCl 150 mM/ glycérol 10%/ Triton X100 1%/ MgCl₂ 1,5 mM/ EGTA 1 mM/ inhibiteurs de protéases « complete™ » (Roche, Indianapolis, Etats Unis) pour la préparation d'extraits protéiques totaux afin de détecter ER α (66 kDa) ou, par le tampon de lyse de formule suivante 1% Triton X100; Tris 50 mM pH 7,4 ; NaCl 150 mM; acide désoxycholique 1%; SDS 0,1%, inhibiteurs de protéases « complete™ » (Roche, Indianapolis, Etats Unis) pour la préparation d'extraits protéiques membranaires afin de détecter CD44 (80 kDa). Les deux tampons de lyse agissent pendant 30 min à 2-4°C, puis seuls les extraits cellulaires membranaires sont centrifugés à 14000 g pendant 10 min (4°C) de façon à ne garder que le surnageant. Ce surnageant pour les extraits protéiques membranaires ou l'ensemble pour les extraits protéiques totaux sont ensuite portés à ébullition 10 min en présence de tampon Laemmli 6X (60 mM Tris pH 7,2, 8% SDS, 48% w/v glycérol, 0,7 M β mercaptoéthanol, 0,2% bleu de bromophénol). La concentration protéique est déterminée en triplicate par un test colorimétrique selon la méthode de Bradford et lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 595 nm (Metertech 960).

50 μ g de protéines des échantillons précédemment préparés ont été déposés sur un gel dénaturant d'acrylamide 8% préparé dans un tampon contenant 0,5 M Tris et 0,4% SDS. Dans un des puits, 7 μ L de marqueurs de poids moléculaire ont été déposés (PageRuler™ Prestained Protein Ladder SM0671, Fermentas, Etats Unis). L'électrophorèse a été réalisée dans un tampon 25 mM Tris, 200 mM Glycine et 0,1% SDS (35 mA/gel). Après migration électrophorétique, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride immobilon-P (Millipore, Bedford, Etats Unis) par électrotransfert semi sec pendant 1 h à 50 mA par gel. La membrane est saturée 1 h à 37°C dans du PBST (PBS 1X, 0,1% de Tween 20) contenant 10% de lait sans matière grasse, afin de générer des interactions protéines-protéines faibles et permettre par la suite une liaison spécifique avec l'anticorps. La membrane est ensuite lavée dans du PBST pendant 5 min sous agitation puis incubée la nuit à 4°C avec un premier anticorps, anti-CD44 (anticorps monoclonal de souris, HCAM, Ab4 clone 156-3C11 Neomarkers, Frémont, Etats Unis) à 0,2 μ g/mL dans du PBST contenant 2% de lait pour le gel contenant les extraits protéiques membranaires. Celui contenant les extraits protéiques totaux est traité de la même façon mais incubé avec l'anticorps ER α (HC20,

référence sc-543, Santacruz Biotechnology, Santa Cruz, Etats Unis) utilisé après dilution à 1/200 dans le lait à 2%. L'anticorps déplace les protéines d'interactions faibles présentes sur son site de reconnaissance spécifique. Le lendemain, après trois nouveaux lavages dans du PBST de 10 min chacun, la membrane est incubée 1 h à 37°C avec le second anticorps qui est soit l'anti souris D1806 dilué à 1/5000 (extraits membranaires), soit l'anti lapin HRP dilué à 1/10000 (extraits totaux) pendant 1 h à 37°C (tous deux produits chez la chèvre, références respectives sc-2005 et sc-2004, Santacruz Biotechnology, Santa Cruz, Etats Unis). La membrane est à nouveau lavée 3 fois 10 min dans du PBST. Les complexes antigéniques sont révélés par chimioluminescence en présence d'une solution de luminol (Santacruz Biotechnology, Santa Cruz, Etats Unis) par autoradiographie de la membrane à l'aide d'un film Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

b) Analyse par cytométrie de flux

A partir des résultats du western blot, des analyses par cytométrie de flux de la lignée n'exprimant pas CD44 (MCF 7 RU), de celle exprimant le plus CD44 (MDA-MB 231) et de celle exprimant à la fois CD44 et ER α (MCF-7 IAL) ont été menées à l'aide d'un cytomètre de flux FACSCalibur Becton Dickinson (Franklin Lakes, Etats Unis). Après lavage par du PBS-FCS 1%, 1.10^5 cellules sont incubées 25 min à 4°C avec l'anticorps anti CD44 marqué au FITC (Clone J.173, Beckman Coulter, California, USA) et avec la sonde de viabilité cellulaire 7-AAD (Beckman Coulter, California, USA), dilué dans du PBS-FCS 1% selon les recommandations du fabricant. Les cellules sont ensuite lavées deux fois dans du PBS-FCS 1% avant d'être reprises dans du DMEM-FCS 1%.

B. Préparation des lipoplexes

1. Obtention du plasmide

La construction plasmidique ER β -flag dans pcDNA3 provient du laboratoire de J.C. Faye (Institut Claudius Régaud, Toulouse). Le plasmide est extrait et purifié dans les bactéries E. Coli après leur transformation par CaCl₂, puis leur amplification. L'ADNc de ER β (2169 pb), couplé à une séquence de reconnaissance flag [Asp-Tyr-Lys-(Asp)₄-Lys] a été au préalable inséré dans le vecteur d'expression pcDNA3 (5427 pb, Invitrogen), contenant un gène de résistance à l'ampicilline, sous contrôle du promoteur CMV (obtenu du cytomégalo virus). Les bactéries transformées par ce plasmide sont étalées sur des boîtes de Pétri de LB (*Lysogeny Broth*) agar en présence d'ampicilline à une concentration de 50 μ g/mL, puis incubées à 37°C

pendant 15 h. Une colonie est prélevée et mise en culture dans 5 mL de LB (contenant de l'ampicilline 50 µg/mL) sur une roue, dans un incubateur à 37°C, pendant 8 h. 1 mL de cette préculture est ensuite ajouté dans des erlenmeyers contenant 600 mL de LB (en présence d'ampicilline 50 µg/mL), et agité à 37°C pendant 12 h (unitron, 150 rpm). Après 24 h, la suspension de bactéries est centrifugée 15 min à 3000 g puis le culot est repris dans 6 mL de GTE (Glucose 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0). Les bactéries sont lysées par 1 mL de GTE contenant 20 mg/mL de lysozyme pendant 10 min à température ambiante. 14 mL d'une solution de NaOH à 0,2 N/SDS 1% préparée extemporanément sont ensuite ajoutés et le tout est incubé 5 min dans un mélange de glace et d'eau. Les protéines, l'ADN génomique et l'ARN de haut poids moléculaire sont précipités par 7 mL d'acétate de potassium 5 M pH 4,8 à 4°C pendant 15 min. Après centrifugation (20 min, 2700 g), le surnageant est récupéré et l'ADN précipité par addition de 0,6 volume d'alcool isopropylique. Après 10 min à température ambiante, l'ADN est centrifugé 20 min à 2100 g. Le surnageant est ensuite éliminé, le culot séché et repris dans 4 mL de TE (Tris pH 7,4 10 mM, EDTA 1 mM). Les ARN résiduels sont ensuite détruits par 20 µL de RNase (10 mg/mL) lors d'une incubation de 15 min à 37°C. Aux 4 mL de ADN/TE sont ensuite ajoutés 80 µL de BET (10 mg/mL) et de chlorure de césium (CsCl) pour obtenir une densité finale de 1,59. Le plasmide est purifié par ultracentrifugation pendant 4 h à 350000 g à 20°C dans un rotor Vti90 (Beckman). L'ADN plasmidique est ensuite prélevé à l'aide d'une seringue et d'une aiguille, puis purifié à nouveau par ultracentrifugation sur gradient de densité de CsCl 4 h à 350000 g à 20°C. Le plasmide est à nouveau prélevé et décomplexé plusieurs fois avec du butanol saturé en eau jusqu'à ce que la coloration rose du BET disparaisse. L'ADN est dilué au ¼ dans du TE, précipité (NaCl 0,1 M final, 2 volumes EtOH), centrifugé (45 min, 3000 g) puis le culot est séché, et repris dans environ 1 mL de TE. La concentration en ADN est déterminée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260 nm. Le volume de TE final est ajusté jusqu'à une concentration de 1 mg/mL.

2. Préparation des formulations

a) Préparation du conjugué HA-DOPE

L'HA de haut poids moléculaire (Sels de sodium, 1600 kDa) est fourni par Acros organics (Geel, Belgique). La L-alpha-dioleylethanolamine (DOPE), co-lipide zwitterionique provient d'Avanti Polar Lipids distribué par Sigma Aldrich (Saint Quentin

Fallavier, France). Le 1-éthyl-3-[3diméthylaminopropyl]carbodiimide (EDC) a été obtenu chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) également.

La préparation du conjugué HA-DOPE (Surace *et al.*, 2009) est basée sur une réaction décrite par Yerushalmi et Margalit (Yerushalmi *et al.*, 1998). 5 mL d'une solution aqueuse d'HA à 2,8 mg/mL pré-incubée pendant 2 h à 37°C avec 600 µL d'EDC à 10 mg/mL à pH 4,0 sont ajoutés à 360 µL d'une dispersion de DOPE à 1 mg/mL à pH 8,6 pendant 24 h à 37°C. Le mélange obtenu est dialysé pendant 12 h (membrane de dialyse Spectrapor Biotech de 16 mm, avec un *cutoff* de 10000 Da, Polylabo, France) et subit trois ultrafiltrations à 3,7 bar d'azote, avec une membrane de cellulose de 10000 Da. La solution est ensuite lyophilisée et conservée à -20°C, avant d'être diluée à 1 mg/mL dans de l'eau MilliQ.

b) Préparation des lipoplexes

La formulation de lipoplexes consiste à complexer le plasmide de ERβ avec des liposomes cationiques de bromure de 2-(2,3 didodecyloxypropyl)hydroxyéthyl ammonium (DE) et de dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) 1:1 m/m selon deux rapports lipides:ADN (L:ADN). Le conjugué HA-DOPE en solution aqueuse à 1 mg/mL, préparé extemporanément, est inclus lors de l'hydratation du film lipidique à 10% (m/m), sous vortex pendant 8 min. La suspension de liposomes à 1 mg/mL est mélangée à volume égal avec la solution de plasmide à 1 µg/µL pour le rapport L:ADN de 1:1 ou à un demi volume de solution de plasmide pour le rapport L:ADN de 2:1. Le mélange est placé 30 min à température ambiante sous azote gazeux avant utilisation. Les lipides cationiques vont ainsi se complexer avec le plasmide porteur de groupements chargés négativement.

C. Mesure de diamètre et de potentiel zêta

Le diamètre des particules est déterminé grâce au Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) par diffusion dynamique de la lumière et l'application de la méthode des cumulants pour déterminer la fonction de corrélation correspondante. Les liposomes et les lipoplexes sont dilués à 2% dans une solution de NaCl à différentes concentrations. Les mesures sont réalisées à 25°C selon un angle d'incidence du faisceau laser de 90°, et sont répétées trois fois. Le potentiel de surface est estimé par mesure du potentiel zêta des lipoplexes à l'aide d'un Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). Les liposomes et les lipoplexes sont dilués à 2% dans une solution de NaCl à différentes

concentrations n'excédant pas 10 mM. Les mesures sont réalisées à 25°C et sont répétées trois fois.

D. Protection du plasmide vis-à-vis de la DNaseI : quantification absolue par qPCR grâce à un étalon externe homologue

10 µL de plasmide à 1 µg/µL (plasmide seul ou au sein de lipoplexes de rapport L:ADN, de 2:1 et de 1:1) sont digérés par 10 UI de DNase I (Invitrogen, Californie, Etats Unis) à 3,66 U/µL pendant 30 min à 37°C en présence de CaCl₂ 1,6 mM et de MgCl₂ 3,1 mM. La réaction est arrêtée par l'ajout d'une solution d'EDTA 50 mM et d'un chauffage à 60°C pendant 10 min. L'extraction des lipides est réalisée par addition de 30 µL d'un mélange de chloroforme/alcool isoamylique/phénol (24/1/25 (v/v/v)). Après agitation vigoureuse, les échantillons sont centrifugés à 9000 g pendant 5 min. L'ADN isolé dans la phase aqueuse, est précipité à -20°C par 10% d'acétate de sodium 3 M, de 2 volumes d'éthanol et de 2 µL de dextran à 10 mg/mL pendant 12 h. Après une centrifugation à 4°C, pendant 15 min à 10000 g puis lavage du culot par 80% d'éthanol, une seconde centrifugation est effectuée à 11000 g pendant 10 min. Enfin, après séchage, les culots sont repris dans 2 mL d'eau MilliQ. Une gamme étalon a été réalisée pour 5 ng/µL, 0,5 ng/µL, 0,05 ng/µL, 0,005 ng/µL, 0,5 pg/µL, 0,05 pg/µL de plasmide ERβ flag ayant été soumis à l'intégralité du protocole subi par les échantillons à doser. Dans chaque capillaire de qPCR, ont ensuite été ajoutés à 2 µL de chaque point de la gamme étalon, ou à 2 µL d'eau MilliQ (contrôle négatif), ou à 2 µL de chaque échantillon à doser, un mélange contenant 10 pmoles de chaque amorce, 12 µL d'eau dépourvue de RNases, 4 µL d'un pré-mélange établi selon les instructions du fournisseur Roche (kit Roche Syber green), contenant une enzyme, ainsi que la sonde fluorescente syber green. Après rapide centrifugation des capillaires, la qPCR (*Quantitative PCR* ou RT PCR pour *real time PCR*) est réalisée sur un LightCycler[®] 1.5 Instrument (Roche Applied Sciences, Mannheim, Allemagne) couplé au logiciel LightCycler[®] version 3.5. Il y a tout d'abord une phase de dénaturation de 10 min à 95°C (20°C/s pour toutes les étapes), avant 40 cycles comportant 10 sec à 95°C, 5 sec à la température d'annelage dépendante des amorces de ERβ flag (62°C, séquence cf figure 2), et 10 sec à 72°C. A la suite de ces cycles, une étape de fusion a lieu à 72°C pendant 15 sec, suivie d'un refroidissement pendant 30 sec à 40°C.

E. Activité du plasmide ER β flag : validation de la construction plasmidique et conservation d'activité sous forme complexée aux liposomes cationiques

Afin de vérifier que la complexation du plasmide codant pour ER β aux liposomes cationiques, ne s'oppose pas à son activité, l'activité de dominant négatif de ER β , complexé aux lipoplexes, vis-à-vis de ER α doit être recherchée. La vérification de cette activité de dominant négatif a été réalisée sur les cellules de cancer du sein MCF-7-RU (exprimant fortement ER α) transfectées transitoirement par une construction contenant une cible nucléotidique de ER α : soit une séquence ERE (*Estrogen Response Element*), activée par l'estradiol, ou soit une séquence AP-1 (*Activator Protein-1*) activée par le TPA (*TetradecanoylPhorbol Acetate* autrement appelé PMA pour *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*). Ces constructions plasmidiques intègrent un gène rapporteur de la luciférase afin de pouvoir quantifier les effets inhibiteurs de ER β par essais Luc, c'est-à-dire par dosage de l'émission lumineuse en présence de luciférine.

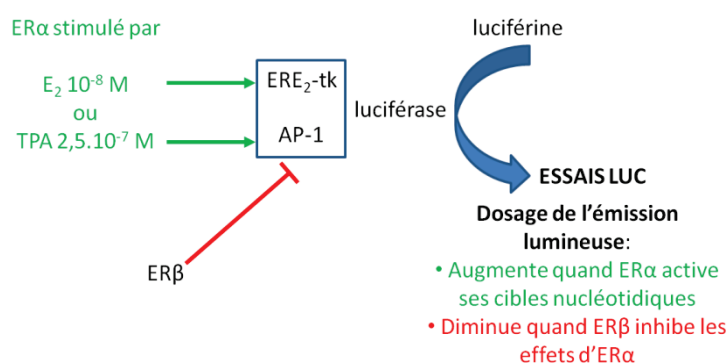


Figure 3 : Description schématique des liens entre le dosage de l'émission lumineuse et l'action d'ER α réprimée ou non par ER β .

Ces plasmides, appelés ERE₂-tk (tk car sous promoteur thymidine kinase) Luc et AP-1 Luc, ont été introduits dans des formulations de lipoplexes d'HA-DOPE à 10% en présence ou non du gène de ER β selon un rapport L:ADN total de 2:1. Les concentrations de traitement sont de 1,0 μ g/mL en ERE₂-tk Luc ou AP-1 Luc et 1,0 ; 1,4 ; 2,3 μ g/mL (de milieu de culture) en ER β . 24 h après la co-transfection, chaque boîte mère est divisée en plusieurs boîtes filles de diamètre plus petit, de façon à obtenir des échantillons ayant eu des transfections homogènes. 8 h après la division, les cellules ont été exposées, ou non, à l'estradiol 10⁻⁸ M (pour les cellules transfectées ERE₂-tk Luc) ou au TPA 2,5.10⁻⁷ M (pour les cellules transfectées AP-1 Luc). Chaque échantillon a été réalisé en triplicat. Enfin 51 h après le début des transfections, les essais Luc ont été effectués par l'application d'un tampon de lyse sur le tapis cellulaire

(Tris 25 mM H₃PO₄ à pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, Triton X100 1%, glycérol 15%, EDTA 1 mM, DTT 1 mM) pendant 15 min à 4°C. Les lysats sont centrifugés à 4°C, pendant 10 min à 14000 g. La quantification de l'activité de la luciférase est réalisée sur un luminomètre Lumat LB 9507 (Berthold, Bad Wildbad, Allemagne) après l'addition de luciférine et d'ATP. Les résultats sont exprimés en indice RLU (*Relative Light Unit*) en fixant à 1, le contrôle exprimant la cible nucléotidique sans stimulation, ni traitement par ERβ. Les expériences ont été répétées en triplicat.

F. Test de viabilité cellulaire MTT

L'effet cytostatique, ainsi que la cytotoxicité *in vitro* des lipoplexes sont évalués par un test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). Le principe de ce test consiste à mesurer la capacité cellulaire à métaboliser le sel de tétrazolium MTT, *via* la déshydrogénase mitochondriale en cristaux violets de formazan. Les cellules sont réparties dans 200 µL de milieu de culture complet à raison de 2,5.10⁴ cellules.mL⁻¹ en plaque 96 puits (TPP, Switzerland) et pré-incubées pendant 24 h. Après incubation des cellules avec différentes formulations d'ADN, lipides et lipoplexes durant 72 h à 37°C et 5% de CO₂, 20 µL de MTT (Sigma Aldrich, Germany) à 5 mg.mL⁻¹ dans le PBS (*phosphate buffered saline*) sont ajoutés dans chaque puits. Au bout de 2 h d'incubation, à 37°C et 5% de CO₂, le milieu de culture est remplacé par 200 µL de DMSO (diméthylsulfoxyde, ACS grade, BioBasic Inc, France) de façon à solubiliser les cristaux de formazan. L'absorbance de la solution est lue à 570 nm (lecteur de microplaque LAB Systems Original Multiscan MS, Finlande). Cette absorbance est proportionnelle à l'activité mitochondriale des cellules. Sur le graphe, l'activité mitochondriale est représentée en pourcentage et calculée à partir du ratio de l'absorbance entre les cellules traitées et non traitées (100% ; n = 8 par conditions).

G. Transfection transitoire *in vitro*

Les cellules MCF-7 ZsGreen, cultivées en milieu sans rouge de phénol etensemencées de façon à être à 30% de confluence lors des traitements, ont été transfectées par 10 µg/mL de formulations de lipoplexes de ERβ de rapport L:ADN de 2:1 ou de 1:1 contenant ou non 10% d'HA-DOPE. Les durées d'incubation lipoplexes/cellules sont de 3 ou 14 h, avant d'effectuer un lavage du tapis cellulaire par du PBS. Les extraits d'ARNm ont été préparés 38 h après la transfection, puis analysés par RT PCR de façon analogue à ce qui a été présenté précédemment (paragraphe II. A. 1.).

H. Essais *in vivo*

1. Etude sur xénogreffes

Des souris *nude* de race Swiss (Charles River, France) (souris sans thymus, ayant un système immunitaire incomplet car déficient en cellules T, ce qui autorise l'implantation de xénogreffe), âgées de 6 semaines sont utilisées en tant que modèle animal. Une suspension cellulaire de MCF-7 IAL à $3,8 \cdot 10^6$ cellules/200 μ L dans un mélange 1:1 de milieu DMEM complet (*ie* supplémenté FCS, PS, glutamine) et de BD Matrigel Matrix (BD Biosciences, San Jose, Etats Unis) est préparée. 200 μ L de cette suspension cellulaire sont injectés au niveau des flancs des souris en sous cutanée à l'aide d'une aiguille 22G. Les souris reçoivent ensuite une stimulation percutanée bihebdomadaire de 20 μ L d'une solution éthanolique d'estradiol à 10^{-2} M (équivalente à 1 mg/kg/semaine) depuis la mise en place de la xénogreffe jusqu'au sacrifice. Cette stimulation percutanée se fait en dorsal au niveau du cou puisqu'à cet endroit se localise du tissu adipeux brun qui a la caractéristique d'être richement vascularisé.

Au bout de plusieurs semaines, les souris porteuses de tumeurs (6 par groupe), dont le volume est proche de 300 mm³ et qui sont en phase de croissance, sont traitées de façon bihebdomadaire avec 200 μ L de lipoplexes à 1 μ g/ μ L (contenant le plasmide pcDNA3, non codant pour la séquence thérapeutique ER β , ou le plasmide ER β , en présence ou non de 10% d'HA-DOPE et présentant un rapport lipides:ADN 2:1 (soit 66 μ g de plasmide)) par administration dans le sinus rétro-orbital (Yardeni *et al.*, 2011). Le volume tumoral est déterminé chaque semaine par mesure de la largeur et de la longueur des tumeurs à l'aide d'un pied à coulisse et par calcul selon la formule : $V_{tumoral} = Longueur^2 \times \frac{largeur}{2}$.

2. Immunohistochimie

Les tumeurs placées dans du Finefix[®] (Milestone s.r.l., Sorisole, Italie), juste après le sacrifice des animaux, sont fixées par quatre bains d'éthanol, puis déshydratées par trois bains de toluène de 30 min à 1 h chacun avant d'être incluses dans de la paraffine chaude. Des coupes de tumeurs de 4 à 5 μ m d'épaisseur, obtenues par découpage au microtome (Leica biosystems, Allemagne), sont montées en lame par chauffage à 56°C pendant 12 h en présence d'eau albuminée au 1/200 sous les « rubans » de tissus. Les coupes sont déparaffinées puis réhydratées respectivement par deux bains successifs de 5 min de toluène, puis d'éthanol et enfin par un bain de 5 min dans l'eau.

a) Etude de l'expression du marqueur de prolifération Ki67

Les épitopes sont démasqués par du tampon citrate (10 mM d'acide citrique, EDTA 2 mM, Tween 20 à 0,5%) à pH 6,2 (7 min à 88°C puis 10 min à température ambiante). Les peroxydases endogènes sont bloquées par une solution d'H₂O₂ à 0,3% en PBS pendant 30 min, à l'abri de la lumière. Les lames sont ensuite saturées pendant 20 min, sous atmosphère humide, par du sérum de cheval dilué au 1/77 dans du PBS. L'anticorps Ki67 (MIB-1) (anticorps souris anti-humain M7240 Dako, Danemark; dilué au 1/75) est alors appliqué pendant 1 h à température ambiante, sous atmosphère humide. Le second anticorps biotinylé, dirigé contre l'espèce souris (kit Elite Vector Vectastain (Biovalley, Conches, France)) et dilué au 1/200, est appliqué pendant 30 min à température ambiante, sous atmosphère humide avant d'appliquer le complexe avidine-biotine selon les instructions du fournisseur.

b) Etude de l'expression du marqueur de néovascularisation des cellules endothéliales murines CD34

Les épitopes sont démasqués par du tampon Tris 10 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 à 0,05% à pH 8 (30 min à 98°C puis 30 min à température ambiante). Les peroxydases endogènes sont bloquées par traitement par une solution d'H₂O₂ à 3% en PBS pendant 30 min, à l'abri de la lumière. Les lames sont ensuite saturées pendant 20 min, sous atmosphère humide, par du sérum de lapin dilué au 1/65 dans du PBS. L'anticorps anti-souris CD34 (clone MEC14.7, HyCult biotechnology, Pays Bas; à 0,005 mg/mL) est alors appliqué pendant 1h à température ambiante, sous atmosphère humide. Le second anticorps, un anti rat biotinylé (kit Elite Vector Vectastain (Biovalley, Conches, France)) dilué au 1/400, est appliqué pendant 30 min à température ambiante, sous atmosphère humide avant d'appliquer le complexe avidine-biotine selon les instructions du fournisseur.

Enfin, pour les deux types d'antigènes recherchés, le chromogène DAB (diaminobenzidine) à 0,05% est appliqué (en présence d'H₂O₂ à 0,01%) pendant moins de 10 min à l'abri de la lumière. Les lames sont contrecolorées par de l'hémalum et montées par de l'Eukitt (CML, Nemours, France) avant d'être conservées à l'abri de la lumière. L'évaluation de chaque lame a été réalisée deux fois, en aveugle.

I. Essais complémentaires à l'IHC sur CD34 : Mesure de l'inhibition de la sécrétion du VEGF par l'expression de ER β

Les cellules MCF-7 IAL, cultivées en milieu sans rouge de phénol et ensemencées de façon à être à 30% de confluence lors des traitements, ont été transfectées par 6, 8 et 10 $\mu\text{g/mL}$ de formulations de lipoplexes de rapport L:ADN de 2:1 contenant le plasmide ER β ou pcDNA3, en présence de 10% d'HA-DOPE. Les cellules ont été incubées avec les lipoplexes pendant 24 h, avant d'être traitées en partie par l'estradiol 10^{-8} M, pendant 24 h de nouveau.

La quantité de VEGF₁₆₅ sécrété dans le milieu de culture cellulaire a été mesurée 48 h post transfection par un test ELISA en phase solide (kit « Quantikine Human VEGF Immunoassay » de R&D systems) conformément aux instructions du fournisseur.

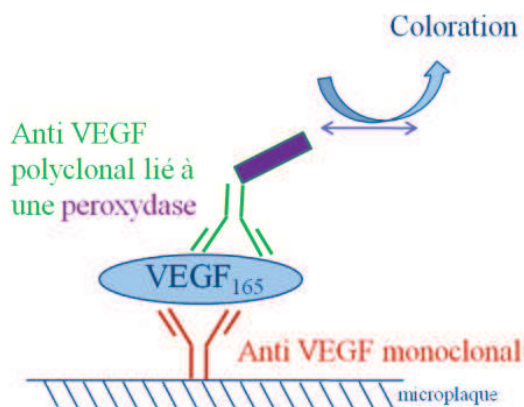


Figure 4 : Principe de dosage du VEGF soluble à partir de 750 μL de milieu de culture des cellules traitées. L'absorbance est lue à 450 nm et rapportée à une gamme étalon établie de 0 à 1000 pg/mL selon les instructions du fournisseur.

III. Résultats et discussion

A. Choix de la lignée cellulaire selon l'expression de ER α et de CD44

L'expression du récepteur des estrogènes ER α et du récepteur membranaire CD44 a été évaluée par RTPCR, Western Blot et cytométrie de flux. Comme le montre les résultats de RTPCR sur la figure 5, aucun ARNm de ER β n'est détecté (ou très faiblement pour la lignée MDA-MB-231). Des ARNm de ER α sont détectés dans les lignées MCF-7 IAL et MCF-7 RU, tandis que ceux de CD44 sont retrouvés dans les lignées MCF-7 IAL et MDA-MB-231.

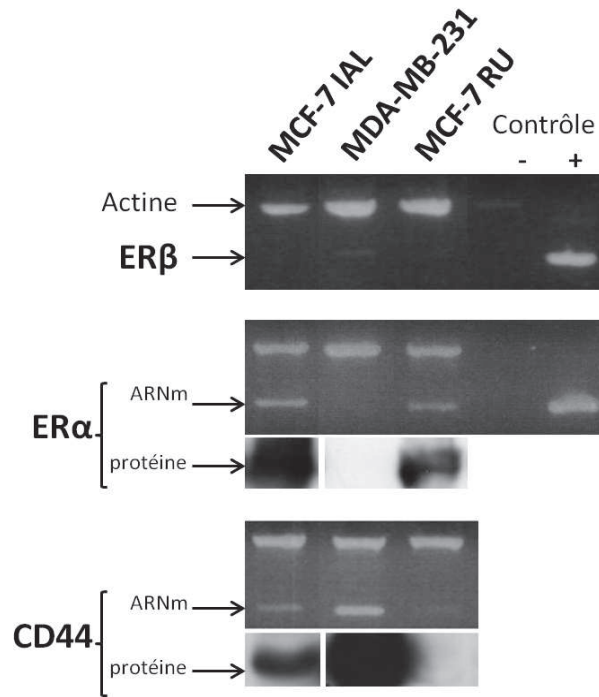


Figure 5 : Expression des ARNm de ER β , ER α et CD44 (par RTPCR) et expression protéique de ER α et CD44 (par Western Blot) dans les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 IAL, MDA-MB-231 et MCF-7 RU. Les contrôles sont constitués d'un plasmide codant pour ER β ou ER α introduit à 100 ng lors de la PCR.

Bien que les niveaux d'expression des ARNm ne soient pas corrélables aux niveaux d'expression protéiques (notamment en raison des diverses régulations post transcriptionnelles et post traductionnelles intervenants après la transcription en ARN ou la traduction en protéines respectivement), les résultats d'expression protéique de CD44 par western blot sont en accord avec les résultats de RT PCR.

Les résultats d'expression protéique du récepteur membranaire CD44, déterminés par western blot, ont été confirmés par des analyses en cytométrie de flux présentées en figure 6.

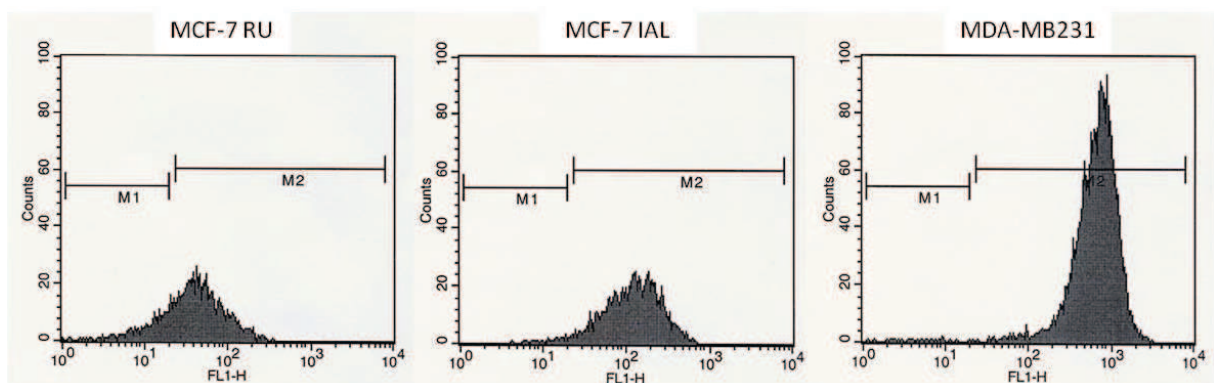


Figure 6 : Histogrammes de cytométrie de flux présentant l'intensité de la fluorescence en axe des abscisses (FL1-H) en fonction du nombre de cellules en axe des ordonnées (*Counts*). La zone M2 définit les niveaux de fluorescence correspondants à une expression de CD44 (par opposition à la zone M1 de non expression). Ordre croissant d'expression (suit le déplacement progressif du pic de la courbe de la zone M1 vers M2) : MCF-7 RU (75% du nombre de cellules total expriment CD44, MFI M2 = 51), MCF-7 IAL (98% du nombre de cellules total expriment CD44, MFI M2 = 117), MDA-MB 231 (100% du nombre de cellules total expriment CD44, MFI M2 = 623).

On observe que respectivement 75%, 98% et 100% des cellules MCF-7 RU, MCF-7 IAL et MDA-MB 231 expriment le récepteur CD44. Le nombre de récepteur CD44 par cellules de la lignée MCF-7 IAL est inférieur de plus d'un facteur 5 à celui présent au sein de la lignée MDA-MB231 et un peu moins de 2 fois supérieur à celui de la lignée MCF-7 RU.

Exprimant de façon homogène CD44 et ayant le récepteur ER α , la lignée MCF-7 IAL convient à la caractérisation de l'effet de l'apport du gène d'ER β dans une lignée exprimant ER α par l'intermédiaire de lipoplexes ciblant le récepteur membranaire CD44.

B. Caractérisations des lipoplexes

1. Diamètre et potentiel zêta

Sur la figure 7 sont représentés les résultats de diamètre des liposomes et des lipoplexes, en présence ou non du conjugué HA-DOPE. On remarque que le diamètre des lipoplexes diminue en présence d'ADN, ce qui montre l'effet de complexation par interaction ionique qui entraîne la formation de particules plus denses comme cela a été observé par Surace *et al.* en cryomicroscopie (Surace *et al.*, 2009). De plus, l'application d'une force ionique équivalente à celle d'une solution isotonique au sang de NaCl (150 mM) n'augmente que de 20 à 30 nm le diamètre des lipoplexes (résultats non montrés ici). Les diamètres sont en outre équivalents entre les deux rapports L:ADN. L'indice de polydispersité est de l'ordre de 0,4 à 0,5 pour les liposomes et diminue à des valeurs de 0,2 à 0,3 dans le cas des lipoplexes.

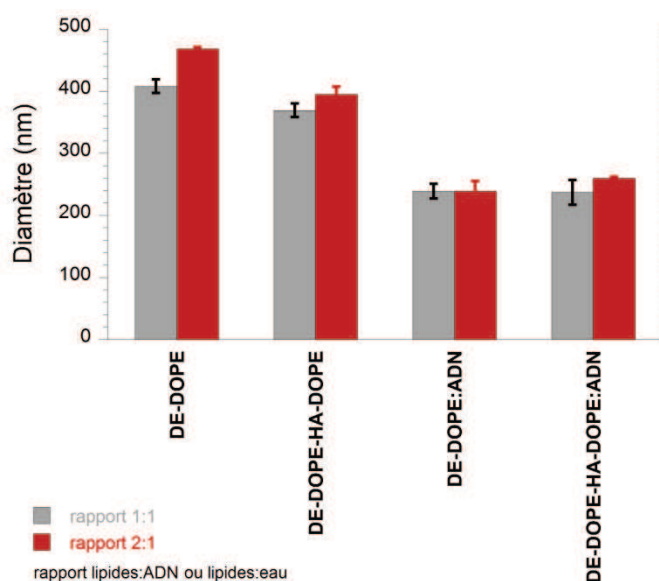


Figure 7 : Diamètres des formulations de liposomes, et de lipoplexes de rapports L:ADN de 1:1 et de 2:1, contenant ou non 10% d'HA-DOPE (n = 2).

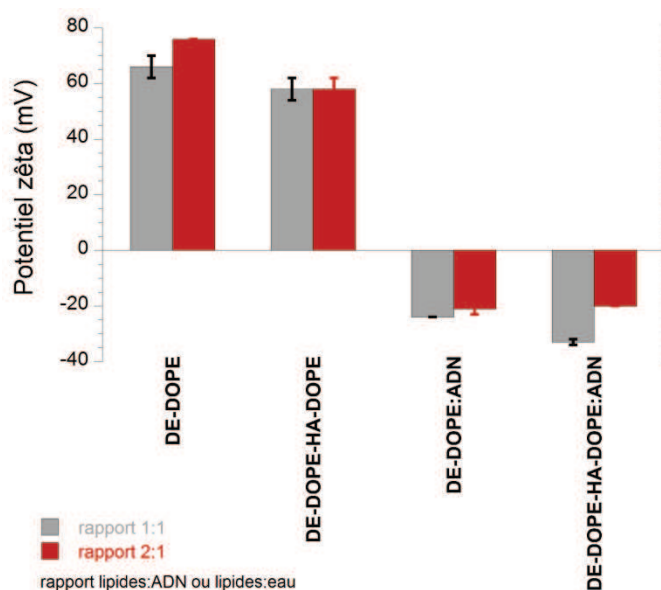


Figure 8 : Potentiels zêta des formulations de liposomes, et de lipoplexes de rapports L:ADN de 1:1 et de 2:1, contenant ou non 10% d'HA-DOPE (n = 2).

Les mesures de potentiel zêta sur les mêmes échantillons (figure 8) montre une inversion de charge des lipoplexes contenant ou non l'acide hyaluronique. De ces résultats, on peut supposer que l'inversion de charge provient de la présence d'ADN plasmidique en surface des particules qui contribue, par la présence de groupements phosphate, à modifier le potentiel zêta pour le rendre négatif.

2. Protection vis-à-vis de la DNase I

Les mesures de potentiel zêta suggèrent fortement qu'une partie de l'ADN complexé serait localisée en périphérie des lipoplexes. Il est donc indispensable de déterminer la proportion d'ADN qui serait stable vis-à-vis des nucléases. L'expérience qui suit, permet de placer les lipoplexes dans des conditions optimales de dégradabilité de l'ensemble de l'ADN qu'ils véhiculent. En effet, l'enzyme est introduite en quantité suffisante pour dégrader l'intégralité de l'ADN contenu dans les lipoplexes et dans des conditions de salinité et de température optimales à son fonctionnement.

La RTq PCR donne le cycle seuil d'amplification permettant la détection de l'ARNm amplifié. La gamme étalon permet une quantification absolue par l'utilisation d'un étalon externe homologue (le plasmide ER β servant à l'étalonnage est inclus dans des capillaires séparés). Les fractions d'ADN conservées après digestion des lipoplexes par la DNase I sont donc déterminées grâce aux valeurs de cycle seuil rapportées à la gamme étalon (figure 9).

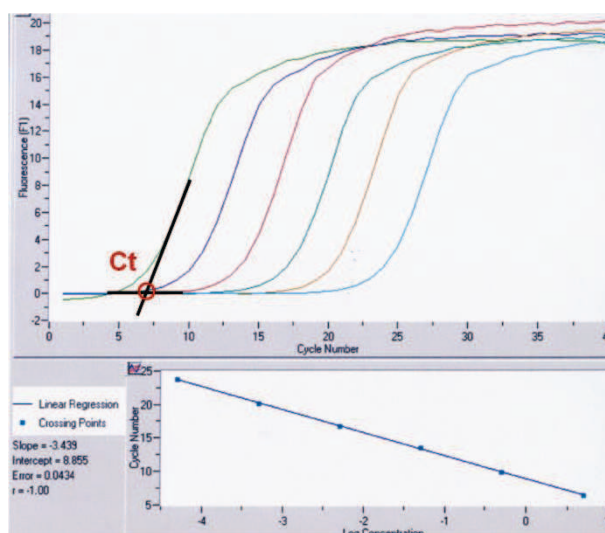


Figure 9 : Gamme étalon obtenue à partir des cycles seuil d'apparition de concentrations décroissantes d'ADN (de 5 ng/μL à 0,05 pg/μL) (détection de la fluorescence en fonction du nombre de cycle visualisable sur la partie supérieure de la figure), en fonction du log de la valeur de la concentration (partie inférieure de la figure). La détermination du Ct (Ct pour *Cycle threshold* ou Cp pour *Crossing point*) est visualisable sur la partie supérieure de la figure. Le Ct correspond au nombre de cycles d'amplification PCR avant apparition d'une quantité suffisante détectable du gène.

Les fractions d'ADN intact, sont de $30 \pm 16\%$ et $13 \pm 7\%$ du plasmide total complexé pour les rapports L:ADN de 2:1 et de 1:1, respectivement (figure 10). En l'absence d'HA-DOPE, la fraction non digérée est de $40 \pm 8\%$ et de $11 \pm 1\%$ pour les rapports L:ADN de 2:1 et de 1:1 respectivement.

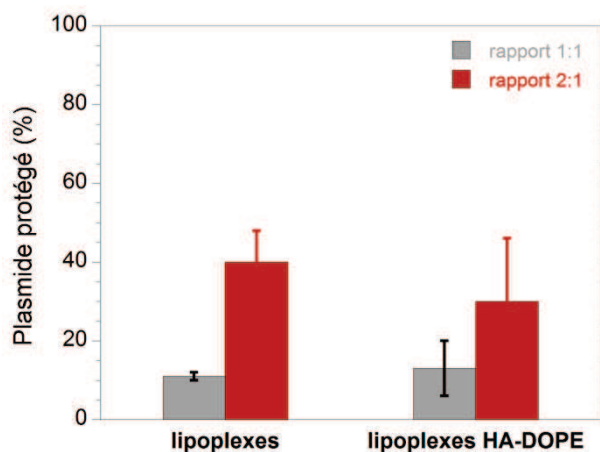


Figure 10 : Pourcentages de fractions d'ADN protégé de la dégradation enzymatique grâce à sa complexation avec les liposomes cationiques de DE-DOPE comportant ou non 10% de conjugué HA-DOPE.

Il y a donc une plus grande fraction d'ADN digérée lorsque le conjugué HA-DOPE est présent dans la formulation. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette fragilité plus importante de l'ADN. Premièrement, le complexe ternaire pourrait être moins stable que le complexe binaire, ce qui permet un plus grand accès de l'ADN vis-à-vis de

l'enzyme. Deuxièmement, le conjugué HA-DOPE est ajouté pendant l'hydratation du film lipidique, et donc avant l'introduction de l'ADN ce qui pourrait localiser une grande partie de l'ADN en périphérie des lipoplexes, les rendant ainsi plus sensible à la digestion par la DNase I.

3. Activité du plasmide ER β flag : validation de la construction plasmidique et conservation d'activité sous forme complexée aux liposomes cationiques

Après homodimérisation du récepteur des estrogènes ER α , celui-ci va se lier sur des sites spécifiques de l'ADN, tels que les ERE (*estrogen response elements*). Cette liaison constitue la première étape de la voie de signalisation classique induite par les estrogènes, permettant la modulation de la transcription de gènes cibles que régule ER α . En présence de ER β , le récepteur ER α subit une hétérodimérisation (Cowley *et al.*, 1997; Pace *et al.*, 1997; Pettersson *et al.*, 1997) et empêche, par liaison de l'hétérodimère ER α /ER β à l'ADN, les effets transcriptionnels de ER α sur ses gènes cibles (Lindberg *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2006). ER α et ER β présentent un fort degré d'homologie de leur domaine protéique de liaison à l'ADN (plus de 95%), ce qui leur permet de reconnaître de façon spécifique les mêmes éléments de réponses situés au niveau des promoteurs des gènes cibles (Pace *et al.*, 1997). Leur domaine de liaison aux ligands, présentant plus de 50% d'homologie, permet aux deux isotypes de ER de lier l'estradiol (E2, 17 β -estradiol) selon des constantes d'affinités quasi similaires (Kuiper *et al.*, 1997).

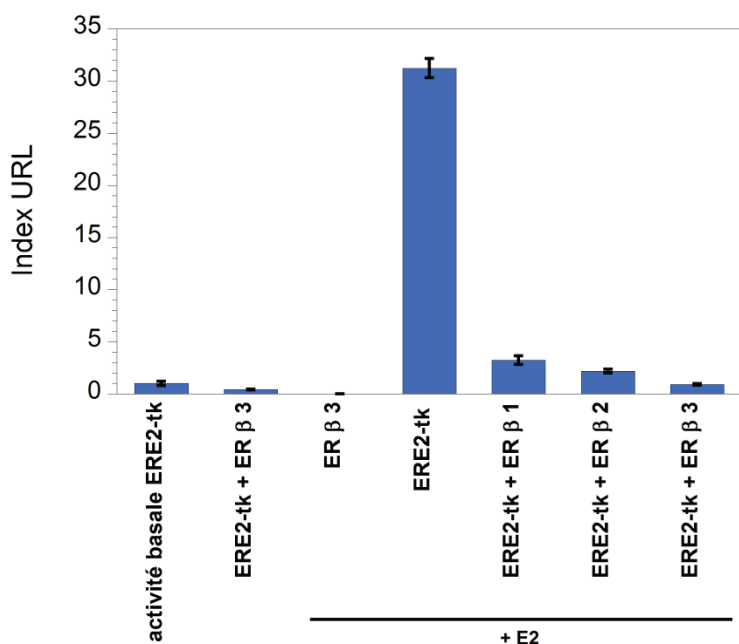


Figure 11 : Co-transfection transitoire dans les cellules MCF-7-RU de la cible nucléotidique de ER α nommée ERE (couplée à la luciférase) et de ER β grâce à une formulation de lipoplexes de rapport 2:1 contenant 10% d'HA-DOPE. ERE est activée par l'estradiol en concentration 10^{-8} M. L'indice URL (unité relative de lumière) du contrôle ERE2-tk sans stimulation par l'estradiol, ni traitement par ER β est fixé à 1 (n = 3).

Sur la Figure 11 est présentée l'activité basale des gènes en l'absence de stimulation par le ligand E2 et en l'absence d'une répression de ER α par ER β (histogramme n°1). Il faut d'abord observer que ER β est capable d'interagir avec le promoteur de ses gènes cibles, en l'absence de ligand (Hall *et al.*, 1999) (histogramme n°2 : ERE2-tk + ER β 3). L'absence de détection d'émission lumineuse est un contrôle normal en l'absence de séquence Luc transfectée (histogramme n°3 : ER β 3 sous stimulation estrogénique). Enfin, le traitement par les lipoplexes ER β permet de réduire l'expression de l'activité luciférase de façon dépendante de la quantité d'ER β transfectée.

ER α et ER β sont également capables d'agir sans liaison direct avec l'ADN, par interaction avec les facteurs de transcription *cJun* et *cFos* liés à l'ADN au site AP-1 (*activator protein-1*) (Kushner *et al.*, 2000). Cette voie de signalisation appartient aux voies non classiques de modulation de la transcription des gènes cibles. *cJun* et *cFos* activent la transcription de gènes possédant des séquences TRE (*TPA response element*) dans leur région promotrice. C'est pourquoi le TPA (*TetradecanoylPhorbol Acetate*) est utilisé en tant qu'agent de stimulation. En fonction des différents traitements, l'expression d'AP1 présente les mêmes profils que l'expression d'ERE (figure 12). En revanche, il faut noter que l'estradiol induit des effets plus importants que le TPA.

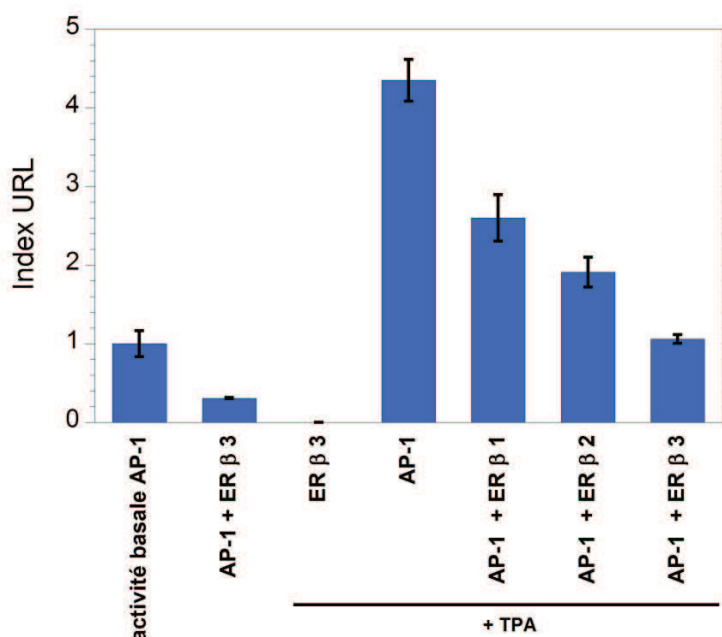


Figure 12 : Co-transfection transitoire dans les cellules MCF-7-RU de la cible nucléotidique de ER α nommée AP-1 (couplée à la luciférase) et de ER β grâce à une formulation de lipoplexes de rapport L:ADN de 2:1 contenant 10% d'HA-DOPE. AP-1 est activée par le TPA (phorbol 12-myristate 13-acétate) en concentration $2,5 \cdot 10^{-7}$ M. L'indice URL (unité relative de lumière) du contrôle AP-1 sans stimulation par le TPA, ni traitement par ER β est fixé à 1 (n = 3).

En conclusion et en accord avec Matthews *et al.* (dans le cas des cellules T47D exprimant ER α (Matthews *et al.*, 2006)), le traitement par les lipoplexes ER β permet de réduire l'expression de l'activité luciférase et par conséquent l'expression de ER β antagonise l'induction par ER α de la voie AP-1 dans la lignée MCF-7-RU.

Ces résultats renseignent donc sur la validité de la construction plasmidique de ER β . Nous avons pu confirmer grâce à l'utilisation de lipoplexes associés au plasmide codant pour ER β , le rôle dominant négatif de ce dernier sur ER α , aussi bien dans un système de liaison directe à l'ADN (ERE) ou par interaction indirecte avec l'ADN (AP-1). De plus, il faut noter que notre système autorise des co-transfections de différents gènes sans perturber l'expression de chacun d'eux.

4. Détermination du seuil de toxicité des lipoplexes sur les cellules MCF-7 IAL

Le plasmide seul n'entraîne pas de cytostaticité (arrêt de prolifération cellulaire), ni de cytotoxicité (mort cellulaire) (figure 13). Les formulations de liposomes présentent des effets plus importants sur les cellules que les formulations de lipoplexes, ce qui peut, entre autres, être expliqué par l'existence de charges de surface plus importantes pour les liposomes. Pour

un même ratio de lipoplexes et pour les formulations de liposomes, la présence d'HA-DOPE induit moins d'effets cytostatiques/toxiques.

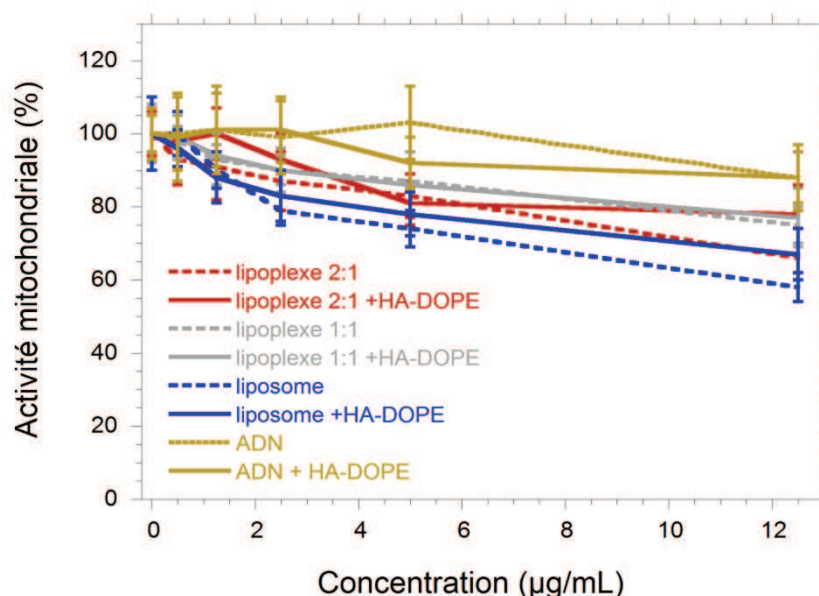


Figure 13 : Test de prolifération et de viabilité cellulaire sur 72 h de traitement (soit plus de deux temps de doublement cellulaire (22 h)) sur des cellules MCF-7 IAL, traité par des lipoplexes de ER β de rapport de L:ADN de 1:1 ou de 2:1 contenant ou non de l'HA-DOPE 10%. Les contrôles sont constitués par du plasmide ER β en présence ou non d'HA-DOPE en concentration équivalente à celle retrouvée au sein du ratio 1:1 (celui présentant la plus grande quantité en plasmide), et des liposomes DE:DOPE 1:1 en présence ou non d'HA-DOPE en concentration équivalente à celle retrouvée au sein du rapport de 2:1 (celui présentant la plus grande quantité en lipides).

Le seuil de viabilité tolérable *in vitro* des formulations de lipoplexes, correspondant à une viabilité cellulaire de 80%, est atteint pour 10 µg de lipoplexes par volume de milieu de culture (1 mL) indépendamment de la nature du plasmide, du type de ratio et de la présence d'HA-DOPE. Cette concentration de 10 µg/mL sera celle employée dans les essais *in vitro*.

5. Transfection transitoire *in vitro*

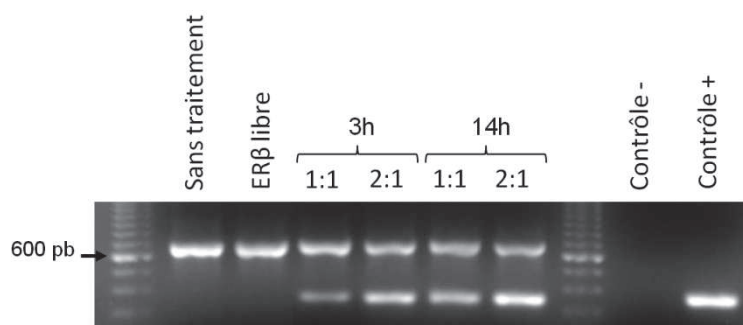


Figure 14 : Expression de l'ARNm de ER β par RTPCR dans les cellules MCF-7 ZsGreen (analogue en termes d'expression de ER α et CD44 aux MCF-7 IAL par PCR, non montré ici) après 3 ou 14 h d'incubation avec le plasmide ER β . Le plasmide ER β est utilisé libre ou complexé aux liposomes cationiques contenant du HA-DOPE 10% selon le rapport L:ADN de 1:1 ou de 2:1. La concentration de traitement est de 10 μ g/mL de milieu de culture (seuil de viabilité). Lors de la transfection, le milieu de culture est utilisé avec 10% de sérum de veau fœtal. Le contrôle positif est effectué à partir de l'amplification de 100 ng de ER β . L'actine, dont l'expression n'est pas régulée par ER β , sert de contrôle interne permettant de normaliser le niveau d'expression d'ER β . Le contrôle positif confirme que l'amplification par l'ARN transcriptase est spécifique d'ER β .

Comme le montre la figure 14, ER β n'est pas exprimé de façon endogène par les MCF-7 ZsGreen conformément aux précédents résultats. De plus, la simple addition de plasmide ER β dans le milieu de culture ne permet pas de détecter l'ARN messager de ER β , ce qui sous entend que les cellules n'ont pas internalisé le plasmide. La présence de 10% de sérum n'inhibe pas la transfection. Le traitement par les lipoplexes entraîne l'expression d'ER β . Cette expression est d'autant plus importante que les temps d'incubation avec les lipoplexes sont prolongés. L'expression est également plus importante lorsque la formulation de lipoplexes suit le rapport L:ADN de 2:1. Ce rapport, conformément aux résultats du chapitre 1, sera celui utilisé *in vivo*.

C. Etude *in vivo* chez la souris *nude* à partir d'un modèle de xénogreffe de cellules humaines MCF-7 IAL

1. Courbes de croissance tumorale

Comme l'atteste la figure 15, au bout de 6 semaines, la mesure du volume des tumeurs des souris traitées avec les lipoplexes de ER β de rapport L:ADN de 2:1 comportant de l'HA-DOPE montre un ralentissement de la croissance tumorale. A l'opposé, aucune diminution du volume tumoral n'est observée pour les lots non traités contrôles, ou traités par les lipoplexes de ER β sans HA-DOPE ou les lipoplexes en présence d'un plasmide non relevant pcDNA3

comportant de l'HA-DOPE. Ce ralentissement se traduit par une différence de volume tumoral d'environ 40% chez les souris traitées par les lipoplexes d'ER β + HA-DOPE comparativement aux autres traitements ou aux témoins.

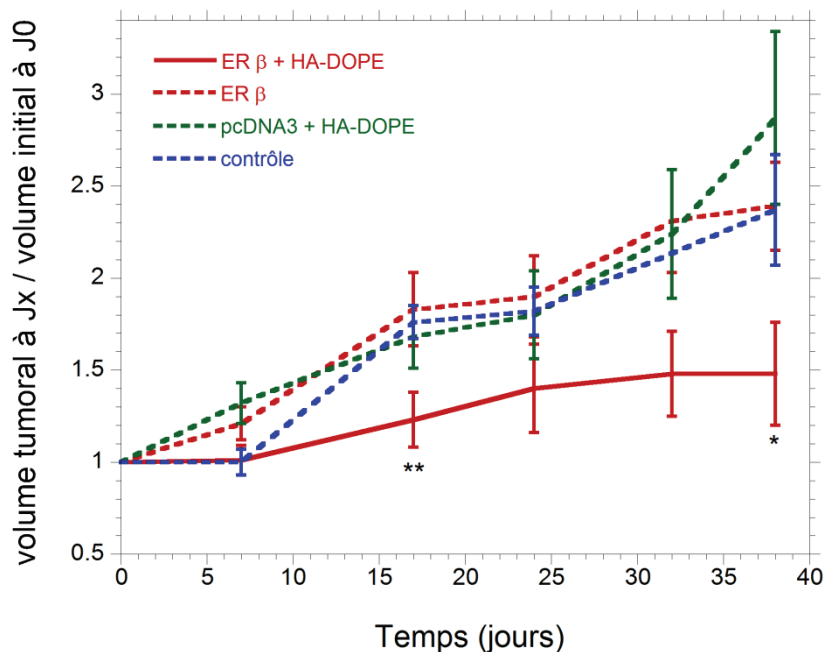


Figure 15 : Courbes de croissance tumorale (volume tumoral à Jx/volume tumoral initial à J0) de xénogreffes de MCF-7 IAL (injectées en sous cutanée à 50% dans du matrigel®, et stimulées pendant 7 semaines par 20 μ L d'une solution éthanolique d'estradiol à 10^{-2} M en percutané, deux fois par semaine, seules les tumeurs en phase de croissance (vérifié par détermination des volumes tumoraux) dont le volume est proche de 300 mm³ ont été utilisées pour l'étude) chez la souris *nude* sur 6 semaines de traitement, à raison de deux injections par semaine en rétro-orbitale (simili intraveineux) de 200 μ L de lipoplexes à 1 μ g/ μ L. Les souris reçoivent une stimulation percutanée bihebdomadaire de 20 μ L d'une solution éthanolique d'estradiol à 10^{-2} M (équivalente à 1 mg/Kg/semaine) avant et pendant es traitements. Après relevé des tailles à l'aide d'un pied à coulisse, le volume des tumeurs est calculé par : $V_{tumoral} = Longueur^2 \times \frac{largueur}{2}$ (n = 6 souris par groupes). Les erreurs standards à la moyenne sont présentées pour chaque point ($ESM = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$). Test de Student entre lot traité par les lipoplexes de ER β + HA-DOPE *versus* lot non traité : ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Ces résultats vont dans le sens de ceux décrits par Hartman dans un modèle de xénogreffe de cancer du sein à cellules T47D exprimant ER α : l'introduction de ER β conduit à l'inhibition de la croissance tumorale (Hartman *et al.*, 2006). Par ailleurs, la présence d'HA de haut poids moléculaire ne démontre pas d'effet délétère par activation de CD44, étant donné que le lot pcDNA3 + HA-DOPE n'a aucun effet favorisant la croissance tumorale. En outre, seul le plasmide ER β en présence de lipoplexes conjugués à l'HA permet d'observer les potentialités d'ER β . En effet, sans HA, on n'observe aucun effet. On peut raisonnablement attribuer cet effet à une plus longue circulation des lipoplexes dans le sang suivie d'une extravasation au niveau du foyer tumoral. Cette étude conforte l'utilisation possible d'HA en tant qu'agent de furtivité au même titre que les PEG. Les aspects de ciblage passif tissulaire sont fortement soutenus par ces essais *in vivo*. En revanche, en ce qui concerne les aspects de ciblage actif de

CD44, il est difficile d'affirmer quoique ce soit, compte tenu du manque d'expériences approfondies.

2. Immunohistologie

a) Diminution de l'indice de prolifération Ki67

Ki67 est une protéine strictement exprimée par les cellules en prolifération. Elle est présente durant toutes les phases actives du cycle cellulaire (G1, S, G2, M), mais est absente lorsque les cellules sont en phase de quiescence G0 (Scholzen *et al.*, 2000).

Les coupes de tumeurs des souris traitées par le plasmide ER β complexé à des liposomes cationiques couplés à HA-DOPE montre une baisse de l'indice de prolifération Ki67 (figure 16). Le traitement par les lipoplexes de ER β + HA-DOPE augmente donc le nombre de cellules en phase de quiescence G0 (ce qui correspond à la sortie de la cellule de son cycle de division).

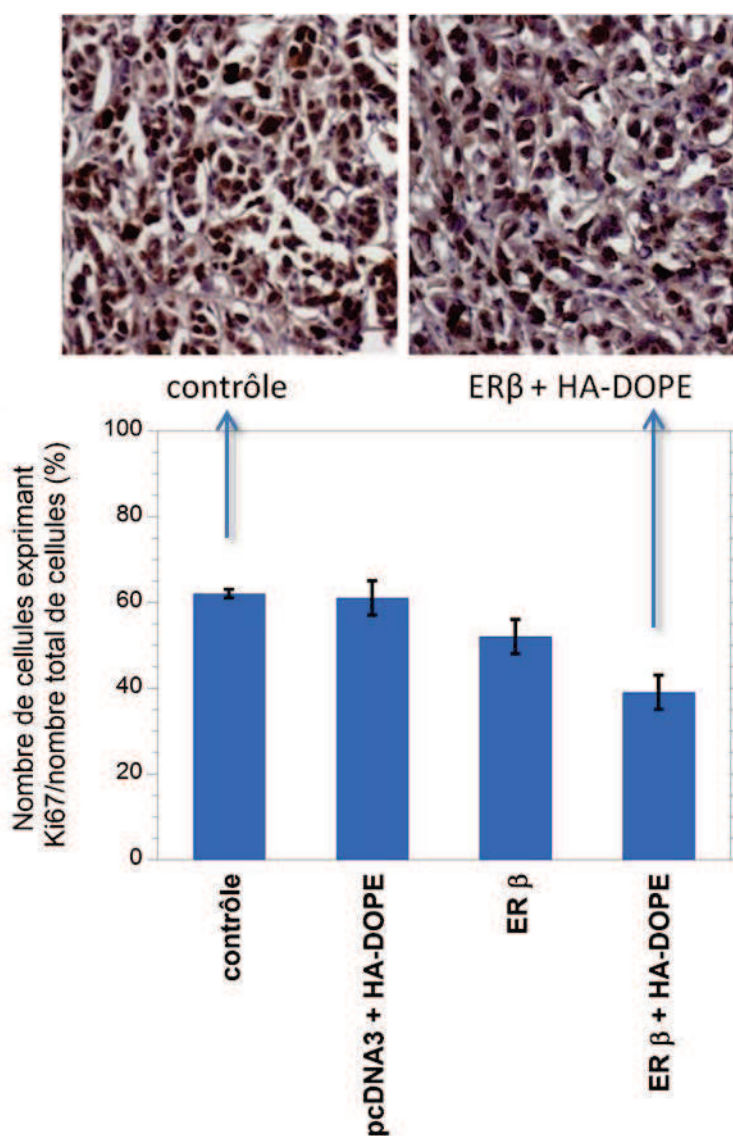


Figure 16 : Partie supérieure : Présentation des différences d'aspects des coupes contrôle et traitées par ER β +HA-DOPE : le contrôle présente plus de cellules en prolifération (Ki67, marron) et la coupe traitée présente une majorité de cellules en phase de quiescence du cycle cellulaire (G0, violette). Partie inférieure : Distribution taxonomique des cellules en prolifération exprimant Ki67 (nombre de cellules exprimant Ki67*100/nombre de cellules totales par comptage visuel sur n = 2 coupes immunohistochimiques par groupe en aveugle).

Ces résultats, accompagnant les observations d'évolution de courbes de croissance du volume tumoral, vont dans le sens d'une réduction de la prolifération des cellules cancéreuses et donc d'un traitement produisant des effets d'amélioration de la pathologie.

b) Diminution du marqueur de néovascularisation CD34

L'angiogénèse correspond à la formation d'une vascularisation propre à la tumeur permettant son développement (Folkman 1971). Le marqueur CD34 est un indicateur de l'état de vascularisation de la tumeur, puisqu'il permet d'évaluer la densité des micro-vaisseaux intratumoraux (Vartanian *et al.*, 1994). Les observations de ces lames ne montrent pas de

baisse du nombre de vaisseaux présents dans les tumeurs traitées par les lipoplexes de ER β + HA-DOPE (figure 17). Cependant, il semblerait que la taille des vaisseaux détectés diminue. Afin de mieux conclure, ces constatations visuelles ont été renforcées par une expérience *in vitro* de mesure du taux du VEGF (*vascular endothelial growth factor*), qui est un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, principal régulateur de l'angiogénèse (Hicklin *et al.*, 2005).

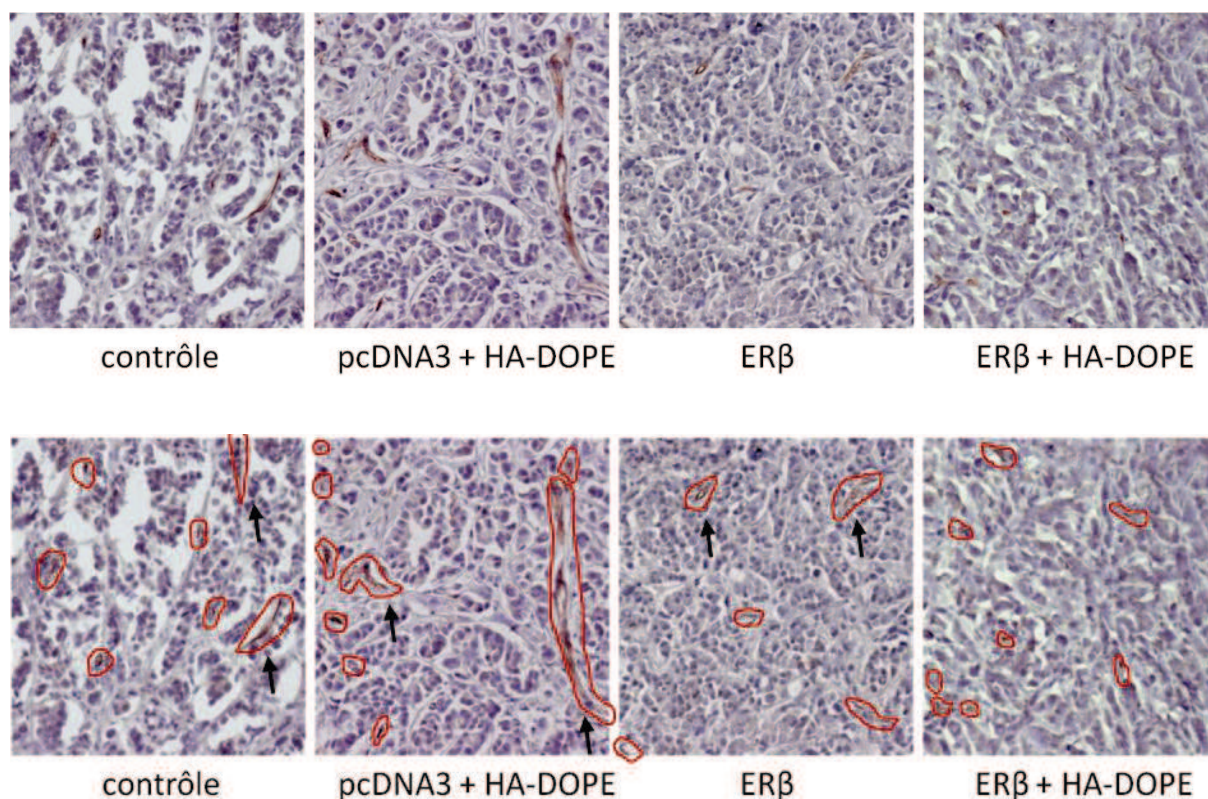


Figure 17 : Photos d'immunohistologie présentant l'état de la vascularisation des tumeurs *via* la détection du marqueur CD34. Les zones délimitées en rouge sont celles qui ont été considérées comme exprimant CD34. Les zones marquées en plus d'une flèche présentent des zones où les vaisseaux apparaissent de taille plus importante.

D. Essais complémentaires à l'IHC sur CD34 : Mesure de l'inhibition de la sécrétion de VEGF par l'expression de ER β *in vitro*

Le VEGF 165 (165 acides aminés) est soluble, et peut être dosé dans le milieu de culture. La forte implication du VEGF dans l'angiogénèse permet d'établir un lien avec les observations en IHC du marqueur de néovascularisation CD34. Ce dosage permet de montrer une éventuelle cohérence avec les études immunohistologiques de CD34 qui sont analysées de façon visuelle et non quantitative.

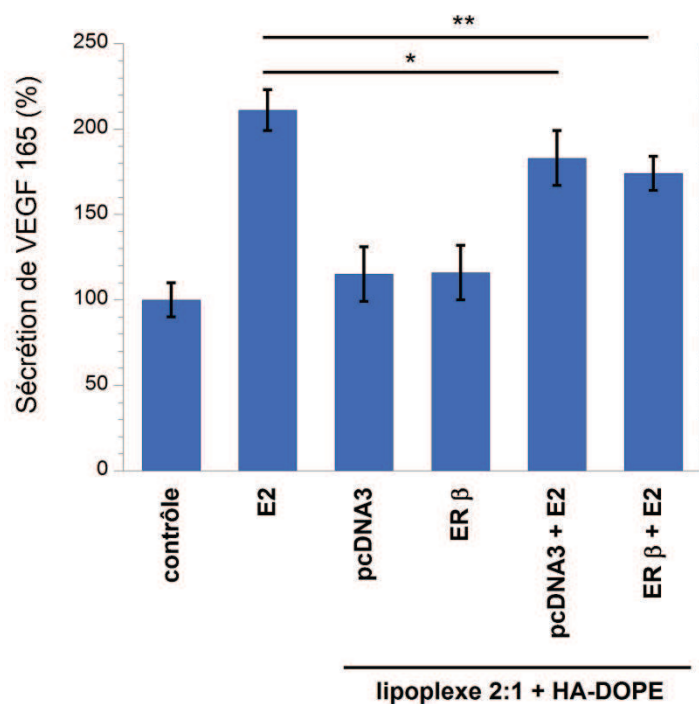


Figure 18 : Mesure du VEGF après 48 h de stimulation par l'estradiol, et 24 h après transfection par 6 µg/mL de lipoplexes de rapport L:ADN de 2:1 contenant le plasmide non relevant pcDNA3 ou la séquence codante de ERβ (MCF-7 IAL) contenant 10% d'HA-DOPE. Test t student, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En présence de ERβ, une diminution faible mais significative du VEGF est observée (dernière colonne de l'histogramme *versus* deuxième colonne, $p < 0,01$, figure 18). En revanche, les lipoplexes contenant une séquence non relevante (pcDNA3), c'est à dire non codante pour ERβ, présente lui aussi une baisse significative du VEGF ($p < 0,05$).

Dans les T47D exprimant ERα, l'introduction de ERβ inhibe l'angiogénèse et réprime la sécrétion de facteurs proangiogéniques tels que VEGF (Hartman *et al.*, 2006). Nous ne retrouvons pas un tel effet dans notre cas. L'apport de ERβ dans les MCF-7 IAL n'agit pas sur l'angiogénèse de façon spécifique. La baisse observée peut être expliquée par l'existence d'une interaction physique du VEGF avec les lipoplexes d'HA-DOPE qui masquerait les épitopes du VEGF nécessaires pour effectuer un dosage par ELISA. Mais, ceci est aussi attribuable à la présence d'HA de haut poids moléculaire dans la formulation, puisque celui-ci a des propriétés anti-angiogéniques (Rooney *et al.*, 1995). Ceci étant le contrôle lipoplexe pcDNA3 sans HA-DOPE manque ici pour le démontrer avec certitude. De plus, il est confirmé ici que la formulation n'a pas d'effet pro-angiogénique avec le type d'HA utilisé (West *et al.*, 1985).

Le traitement des cellules MCF-7 IAL par des lipoplexes ER β contenant de l'HA-DOPE n'a donc pas d'effet sur l'angiogénèse. Cette absence d'effet est un point fort pour notre système de vectorisation du plasmide ER β . En effet, si notre traitement conduisait à une réduction de l'angiogénèse, l'application de notre stratégie de vectorisation se verrait fortement affaiblie, voir inefficace. En effet, l'accessibilité de la tumeur deviendrait un point critique. Les effets sur la prolifération des cellules tumorales sont donc prédominants pour expliquer la réduction du volume tumoral. Les effets d'inhibition de la prolifération sont explicables par l'action de ER β sur les divers intervenants du cycle cellulaire (Liu *et al.*, 2002; Paruthiyil *et al.*, 2004; Strom *et al.*, 2004; Paruthiyil *et al.*, 2011).

Ces observations sont en accord avec le fait qu'aucune corrélation ne peut être faite entre la densité des microvaisseaux intratumoraux (mesure de l'angiogénèse par IHC avec un anti-CD34) et la prolifération des cellules tumorales (expression du Ki67 étudiée par IHC avec l'anticorps MIB1), puisque tous deux seraient dépendants de mécanismes différents (Vartanian *et al.*, 1994). La mesure de l'angiogénèse est corrélable à l'apparition de métastases (Horak *et al.*, 1992) et est nécessaire à la croissance de la tumeur en tant que « tissu » (Folkman 1990). Cependant, à l'échelle cellulaire, l'angiogénèse est indépendante de l'état de prolifération des cellules tumorales. En effet, l'angiogénèse autorise une expansion rapide de la tumeur, si les cellules tumorales sont capables de proliférer rapidement (Folkman 1990).

IV. Conclusion

Cette démarche de thérapie génique, ayant pour but de rétablir l'orientation de la balance d'expression de ER α et de ER β en faveur de ce dernier, afin de mettre en avant ses effets anti prolifératifs et anti angiogéniques, a été possible grâce à l'utilisation des lipoplexes que nous avons développés. Dans un premier temps, une caractérisation physico-chimique a été effectuée pour déterminer le diamètre, les charges de surface et la capacité de protection de l'ADN des lipoplexes vis-à-vis des dégradations enzymatiques. Elles nous ont permis ensuite de mieux appréhender le système complexant ce plasmide ER β . Il a été prouvé que la construction plasmidique utilisée permettait non seulement l'expression de ER β , mais permettait aussi l'action dominante négative de ER β sur les gènes cibles de ER α (Hall *et al.*, 1999; Lindberg *et al.*, 2003). De plus, ces résultats ne sont pas modifiés par la complexation du plasmide aux liposomes cationiques.

Le choix du modèle cellulaire, exprimant à la fois ER α et CD44, a pu être réalisé suite à l'étude de trois lignées cellulaires de cancer du sein par recherche des ARNm et des protéines. Les résultats ont mené au choix de la lignée MCF-7 IAL. Dans ce modèle, les lipoplexes permettent jusqu'à une concentration élevée (comparée aux concentrations recommandées pour des systèmes commerciaux de transfection) de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ une conservation de 80% de viabilité cellulaire. Les tests de transfection menés à cette concentration sur la lignée MCF-7 IAL ont validé la capacité de transfection *in vitro* des liposomes cationiques complexés à ER β , avant de pouvoir envisager un essai *in vivo*. L'obtention de xénogreffes de cellules MCF-7 IAL chez des souris *nudes*, après stimulation estrogénique a permis de pouvoir débiter les traitements par les lipoplexes de pcDNA3 contenant ou non la séquence codante pour ER β , avec ou sans HA-DOPE dans la formulation. Les courbes d'évolution du volume tumoral suite au traitement par les lipoplexes en voie iv et stimulation estrogénique percutanée montrent un ralentissement de la croissance sur six semaines pour le lot traité par les lipoplexes de ER β avec HA-DOPE. Ces observations sont confortées par une baisse de la prolifération, démontrée par une diminution du marqueur de prolifération Ki67. En revanche, le traitement par ER β n'entraîne pas d'effet sur l'angiogénèse de la tumeur, ni sur le relargage de VEGF *in vitro*. Ainsi dans ce modèle cellulaire, ER β a pu par vectorisation exercer ses actions sur la prolifération par arrêt du cycle cellulaire (Liu *et al.*, 2002; Paruthiyil *et al.*, 2004; Strom *et al.*, 2004; Paruthiyil *et al.*, 2011), sans lien avec l'angiogénèse. Ceci étant, l'action de ER β sur l'angiogénèse a été décrit dans le modèle T47D (Hartman *et al.*, 2006).

D'autres ont également montré que l'estradiol et ses agonistes induisent l'expression de VEGF dans différentes cellules du cancer du sein par des effets transcriptionnels des ER, sans pour autant discriminer qui de ER α ou ER β étaient majoritairement responsables (Buteau-Lozano *et al.*, 2002). L'analyse de différents modèles transgéniques de souris fait cependant apparaître le rôle prédominant de ER α dans les effets vasculaires des ER (Arnal *et al.*, 2010). Ainsi, par répression des effets de ER α , ER β devrait diminuer de façon indirecte l'angiogénèse. Les conditions de nos expériences n'ont en tout cas pas permis de mettre en évidence de tels effets, car ils ne sont peut être pas prédominants. En revanche, les effets de ralentissement de la croissance tumorale par effet de ER β sur la prolifération des cellules composant la tumeur ont été démontrés. La vectorisation ciblée d'un plasmide exprimant ER β permet donc une preuve de principe, premièrement sur la faisabilité d'une démarche de thérapie génique *via* les lipoplexes d'HA-DOPE et deuxièmement sur le rapport de dominance négative de ER β sur ER α .

La protéine ER β n'a pas pu être mise en évidence par un anticorps anti-ER β , car ceux existants en notre possession n'étaient pas performants (Wu *et al.*, 2012), ou par un anticorps anti-flag à cause de difficultés d'adaptation du protocole d'immunohistologie par manque de contrôle positif. En revanche, la recherche des ARNm de ER β dans les tumeurs est encourageante : une tumeur exprime clairement ER β , et trois très faiblement sur les neuf échantillons traités par les lipoplexes de ER β contenant l'HA-DOPE (figure 19).

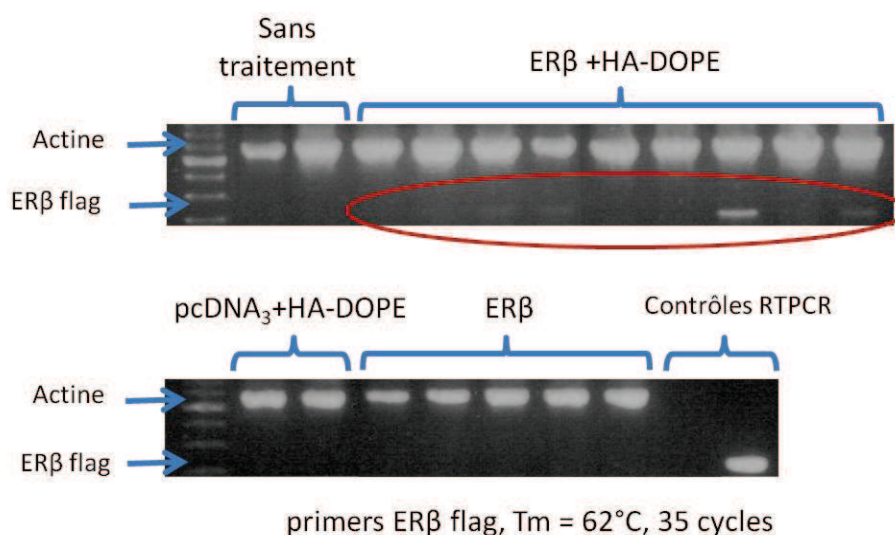


Figure 19 : Premiers essais de l'analyse de l'expression de l'ARNm de ER β dans les tumeurs. Des primers ER β -flag (étiquette « flag » constituée de huit acides aminés Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys), spécifiques de l'ADN vectorisé, ont été utilisés pour éviter la détection d'éventuels ARNm de ER β endogènes. L'essai a été réalisé avec 35 cycles d'amplification.

Pour conclure, l'efficacité produite *in vivo* par le conjugué HA-DOPE est indéniable, contrairement au contrôle sans conjugué. L'apport d'efficacité peut être attribué à un gain de furtivité dans la circulation sanguine qui devrait être confirmé par des études de pharmacocinétique. Si l'on retient les études d'immunoélectrophorèse 2D réalisées dans le chapitre 1 de ce mémoire, les lipoplexes ne contenant pas d'HA-DOPE présentent des profils peu activants du système du complément. Ceci laisse sous entendre que les lipoplexes sans conjugué sont eux aussi potentiellement furtifs. C'est en effet ce que les essais d'activation du complément cherchent à estimer dans la plupart des autres études (Bertholon *et al.*, 2006; Vonarbourg *et al.*, 2006). Comment deux formulations identiques en termes d'activation du complément peuvent-elles montrer une si grande différence d'efficacité *in vivo* ? Si on considère que les deux formulations peuvent être à égalité pour établir un ciblage passif tumoral, par extravasation à travers les endothéliums fenestrés des tumeurs, c'est que la différence s'effectue au niveau cellulaire en raison du meilleur ciblage réalisé par le conjugué HA-DOPE. Un autre aspect pourrait être que l'HA-DOPE a pu permettre la sélection de cellules stratégiques exprimant CD44, les CSC.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 3983-3988.

Arnal JF, Fontaine C, Billon-Gales A, Favre J, Laurell H, Lenfant F and Gourdy P (2010). "Estrogen receptors and endothelium." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(8): 1506-1512.

Bertholon I, Vauthier C and Labarre D (2006). "Complement activation by core-shell poly(isobutylcyanoacrylate)-polysaccharide nanoparticles: influences of surface morphology, length, and type of polysaccharide." *Pharm Res* 23(6): 1313-1323.

Buteau-Lozano H, Ancelin M, Lardeux B, Milanini J and Perrot-Applanat M (2002). "Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta." *Cancer Res* 62(17): 4977-4984.

Chang EC, Frasor J, Komm B and Katzenellenbogen BS (2006). "Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells." *Endocrinology* 147(10): 4831-4842.

Cowley SM, Hoare S, Mosselman S and Parker MG (1997). "Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA." *J Biol Chem* 272(32): 19858-19862.

Dontu G, El-Ashry D and Wicha MS (2004). "Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor." *Trends Endocrinol Metab* 15(5): 193-197.

Durst B, Sorg RV, Roder G, Betz B, Beckmann MW, Niederacher D, Bender HG and Dall P (2001). "The influence of hormones on CD44 expression in endometrial and breast carcinomas." *Oncol Rep* 8(5): 987-993.

Folkman J (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." *N Engl J Med* 285(21): 1182-1186.

Folkman J (1990). "What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?" *J Natl Cancer Inst* 82(1): 4-6.

Hall JM and McDonnell DP (1999). "The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens." *Endocrinology* 140(12): 5566-5578.

Harrell JC, Dye WW, Allred DC, Jedlicka P, Spoelstra NS, Sartorius CA and Horwitz KB (2006). "Estrogen receptor positive breast cancer metastasis: altered hormonal sensitivity and tumor aggressiveness in lymphatic vessels and lymph nodes." *Cancer Res* 66(18): 9308-9315.

Hartman J, Lindberg K, Morani A, Inzunza J, Strom A and Gustafsson JA (2006). "Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts." *Cancer Res* 66(23): 11207-11213.

Hicklin DJ and Ellis LM (2005). "Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis." *J Clin Oncol* 23(5): 1011-1027.

Honeth G, Bendahl PO, Ringner M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lovgren K, Grabau D, Ferno M, Borg A and Hegardt C (2008). "The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors." *Breast Cancer Res* 10(3): R53.

Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K and Harris AL (1992). "Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer." *Lancet* 340(8828): 1120-1124.

Kaipparattu BA, Malik S, Konduri SD, Liu W, Rokavec M, van der Kuip H, Hoppe R, Hammerich-Hille S, Fritz P, Schroth W, Abele I, Das GM, Oesterreich S and Brauch H (2008). "Estrogen-mediated downregulation of CD24 in breast cancer cells." *Int J Cancer* 123(1): 66-72.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S and Gustafsson JA (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." *Endocrinology* 138(3): 863-870.

Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM and Webb P (2000). "Estrogen receptor pathways to AP-1." *J Steroid Biochem Mol Biol* 74(5): 311-317.

Lazennec G (2006). "Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis." *Cancer Lett* 231(2): 151-157.

Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C and Vignon F (2001). "ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells." *Endocrinology* 142(9): 4120-4130.

Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA and Ohlsson C (2003). "Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice." *Mol Endocrinol* 17(2): 203-208.

Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH, Jr., Pestell RG and Kushner PJ (2002). "Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression." *J Biol Chem* 277(27): 24353-24360.

Matthews J, Wihlen B, Tujague M, Wan J, Strom A and Gustafsson JA (2006). "Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters." *Mol Endocrinol* 20(3): 534-543.

Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, Coombes RC and Ali S (1997). "Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha." *J Biol Chem* 272(41): 25832-25838.

Paruthiyil S, Cvorovic A, Tagliaferri M, Cohen I, Shtivelman E and Leitman DC (2011). "Estrogen receptor beta causes a G2 cell cycle arrest by inhibiting CDK1 activity through the regulation of cyclin B1, GADD45A, and BTG2." *Breast Cancer Res Treat* 129(3): 777-784.

Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL and Leitman DC (2004). "Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest." *Cancer Res* 64(1): 423-428.

Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG and Gustafsson JA (1997). "Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha." *Mol Endocrinol* 11(10): 1486-1496.

Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Milanezi F, Schmitt F and Paredes J (2011). "Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype." *J Clin Pathol* 64(11): 937-946.

Rooney P, Kumar S, Ponting J and Wang M (1995). "The role of hyaluronan in tumour neovascularization (review)." *Int J Cancer* 60(5): 632-636.

Scholzen T and Gerdes J (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *J Cell Physiol* 182(3): 311-322.

Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J and Gustafsson JA (2004). "Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(6): 1566-1571.

Surace C, Arpicco S, Dufay-Wojcicki A, Marsaud V, Bouclier C, Clay D, Cattel L, Renoir JM and Fattal E (2009). "Lipoplexes targeting the CD44 hyaluronic acid receptor for efficient transfection of breast cancer cells." *Mol Pharm* 6(4): 1062-1073.

Treeck O, Lattrich C, Springwald A and Ortmann O (2009). "Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells." *Breast Cancer Res Treat*.

Vartanian RK and Weidner N (1994). "Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma." *Am J Pathol* 144(6): 1188-1194.

Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P and Benoit JP (2006). "Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems." *Biomaterials* 27(24): 4356-4373.

West DC, Hampson IN, Arnold F and Kumar S (1985). "Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid." *Science* 228(4705): 1324-1326.

Wu X, Subramaniam M, Negron V, Cicek M, Reynolds C, Lingle WL, Goetz MP, Ingle JN, Spelsberg TC and Hawse JR (2012). "Development, characterization, and applications of a novel estrogen receptor beta monoclonal antibody." *J Cell Biochem* 113(2): 711-723.

Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, Huizing M and Hoogstraten-Miller S (2011). "Retro-orbital injections in mice." *Lab Anim (NY)* 40(5): 155-160.

Yerushalmi N and Margalit R (1998). "Hyaluronic acid-modified bioadhesive liposomes as local drug depots: effects of cellular and fluid dynamics on liposome retention at target sites." *Arch Biochem Biophys* 349(1): 21-26.

Discussion générale

I. Contexte

L'apport d'un gène thérapeutique est une stratégie prometteuse pour un traitement anticancéreux, prenant en compte la source du dérèglement pathologique. A l'heure actuelle, la délivrance efficace d'un gène d'intérêt thérapeutique demeure le handicap majeur de la thérapie génique. La nano-vectorisation doit permettre de donner des réponses aux nombreux obstacles rencontrés lors de l'administration d'ADN nu. Parmi les différents systèmes possibles pour la vectorisation des gènes, nous avons choisi de développer un vecteur synthétique à base de lipides cationiques assemblés sous forme de **liposomes**. Ce nanosystème est capable de condenser des plasmides par complexation de charges, qui sont une forme d'ADN aisément exploitable par les cellules. Le complexe obtenu porte le nom de **lipoplexe** (Figure 1).

Afin d'établir une formulation de lipoplexes performante, les différents obstacles qui se présentent lors d'une administration intraveineuse ont été recensés :

- dégradation de l'ADN,
- agrégation des nanovecteurs,
- opsonisation et phagocytose macrophagique,
- accessibilité du tissu tumoral,
- accessibilité de la cellule stratégique pour l'expression du gène vectorisé,
- franchissement de la membrane plasmique et séquestration endo-lysosomale.

La conception d'un vecteur ciblé de thérapie génique anticancéreuse destiné à la voie intraveineuse doit protéger l'ADN vectorisé, et répondre à des critères de taille, de charge de surface, et d'efficacité d'apport du gène depuis la circulation sanguine jusqu'au compartiment cellulaire souhaité.

L'emploi de PEG étant inadapté dans le cas des vecteurs de thérapie génique puisqu'il peut inhiber la transfection (Bally *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2002), il est nécessaire de développer d'autres approches pour obtenir des lipoplexes « furtifs » qui présentent des capacités de transfection intéressantes. De récents travaux issus de notre laboratoire ont montré que l'emploi d'HA de haut poids moléculaire constituait une nouvelle stratégie pour formuler des lipoplexes capables d'améliorer la transfection de cellules de cancer du sein (Surace *et al.*, 2009, Cf. préambule aux travaux expérimentaux). Nous avons aussi supposé que l'HA de haut poids moléculaire, en tant que longue chaîne hydrophile, peut permettre un ciblage passif tumoral des lipoplexes. En effet, si l'HA est capable d'augmenter la rétention plasmatique des

lipoplexes en évitant la clairance macrophagique, ceux-ci pourront exploiter l'effet EPR au niveau de la tumeur. Par ailleurs, l'HA est un ligand du récepteur membranaire CD44, présent à la surface des CSC du cancer du sein notamment. Ainsi, la reconnaissance ligand-récepteur entre HA et CD44 permet de sélectionner la cellule cible par affinité du lipoplexe associé à l'HA pour le récepteur cellulaire CD44 (Mizrahy *et al.*, 2011). L'association de l'HA aux lipoplexes ne doit empêcher ni d'obtenir un système stable, ni la complexation des liposomes cationiques aux plasmides, mais permettre une distribution externe de l'HA. Pour cela, un conjugué d'HA de haut poids moléculaire et de lipide DOPE, nommé HA-DOPE, a été synthétisé afin de lier l'HA de façon covalente aux lipoplexes (Peer *et al.*, 2004; Peer *et al.*, 2004). Outre l'intérêt biologique qui est d'éviter l'activation de voies cellulaires délétères engendrées par les fragments d'HA, le choix d'un HA de haut poids moléculaire permet d'augmenter le ciblage cellulaire. En effet, la capture cellulaire augmente en fonction du poids moléculaire de l'HA (de 5 à 350 kDa) (Qhattal *et al.*, 2011). Enfin, le lipide cationique utilisé, le DE est un lipide cationique innovant et non commercial, ayant la particularité de posséder des chaînes courtes en C12 saturées, et ayant démontré de bonnes capacités de transfection lorsqu'il est associé avec différents colipides (Arpicco *et al.*, 2004; De Rosa *et al.*, 2008; Surace *et al.*, 2009).

Faisant suite aux travaux de Surace *et al.*, 2009, le but de notre étude a été de comprendre la formation des lipoplexes, c'est-à-dire de montrer l'association de l'HA aux lipoplexes, de réaliser des caractérisations physicochimiques plus approfondies, et de comprendre les mécanismes d'endocytose en utilisant un plasmide modèle codant pour la GFP (permettant, grâce à sa fluorescence, une quantification efficace des taux de transfection). Notre travail a ensuite consisté à utiliser ces connaissances en les appliquant *in vivo* à l'administration d'un plasmide thérapeutique codant pour le récepteur des estrogènes ER β , suppresseur de tumeur (Lazennec *et al.*, 2001; Paruthiyil *et al.*, 2004; Strom *et al.*, 2004; Hartman *et al.*, 2006; Treeck *et al.*, 2009; Paruthiyil *et al.*, 2011), au sein d'un modèle de xénogreffes sous cutanées de cancer du sein estrogéno-dépendants.

II. Association du conjugué HA-DOPE aux lipoplexes

L'obtention des lipoplexes est réalisée par complexation de liposomes cationiques avec du plasmide selon différents rapports lipides:ADN (L:ADN) allant de 1 à 10 (Figure 1).

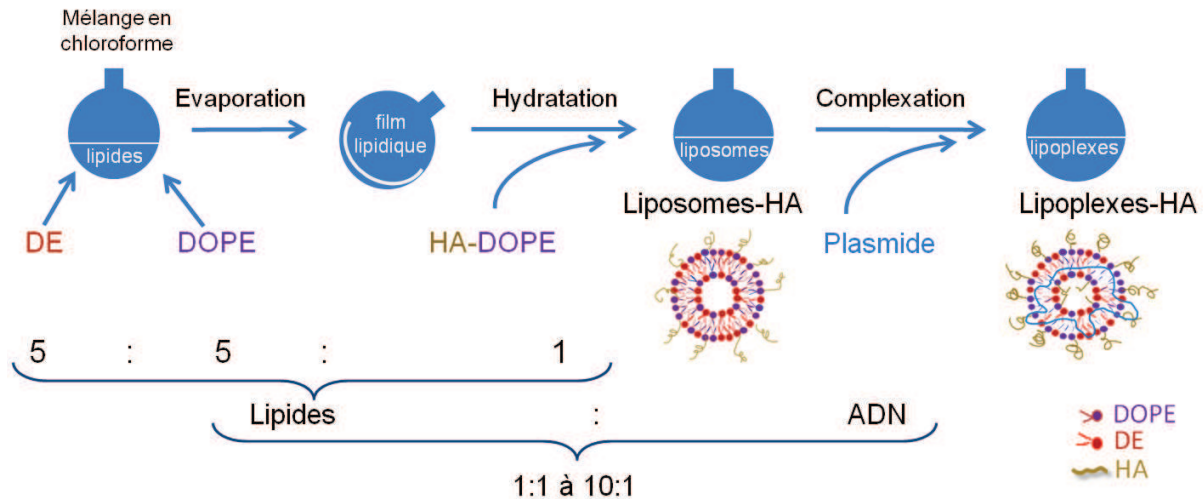


Figure 1 : Préparation des lipoplexes. 1. Préparation de la suspension de liposomes cationiques contenant le conjugué HA-DOPE par mélange des lipides en solution chloroformique, évaporation du solvant et hydratation du film lipidique par une solution aqueuse de HA-DOPE. 2. Obtention de la suspension de lipoplexes par complexation des plasmides et des liposomes selon différents rapports L:ADN allant de 1 à 10. (Tous les rapports présentés sont des rapports massiques.)

A. Affinité du conjugué pour les lipides

Le postulat de départ de notre formulation est basé sur le fait que le greffage du lipide DOPE sur l'HA hydrophile crée un conjugué ayant une affinité pour les lipides (sans pour autant parler d'une réelle amphiphilie au regard de la différence de poids moléculaire entre les deux composés). Cette affinité de l'HA pour les lipides, acquise grâce au greffage du lipide DOPE, a été vérifiée par analyse calorimétrique différentielle à balayage. La partie lipidique du conjugué est donc bien susceptible d'interagir avec la bicouche des liposomes, permettant alors la distribution de l'HA à leurs surfaces comme confirmé par mesure du potentiel zêta. Il y a en moyenne six chaînes de DOPE par molécule de conjugué HA-DOPE (Surace *et al.*, 2009) et il ne reste pas d'HA libre décelable par électrophorèse capillaire dans le conjugué HA-DOPE synthétisé. La répartition de l'HA en surface pourrait donc se faire à partir de différents points d'ancrage. C'est pourquoi les conformations classiques de répartition des chaînes hydrophiles en surface des nanovecteurs dites en « brosse » ou en « champignon », auxquelles on se réfère généralement (Vonarbourg *et al.*, 2006), sont peu probables. Une répartition selon différents points d'ancrage est proposée (Figure 2).

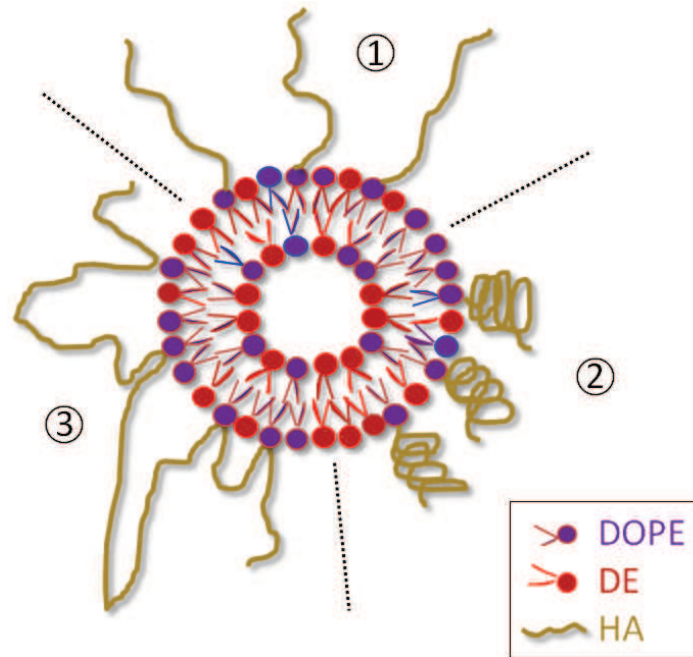


Figure 2: Distribution possible de chaînes polymériques en surface des liposomes DE-DOPE. Cas 1 en « brosse », cas 2 en « champignon » et cas 3 probable selon une répartition en multi-insertion des chaînes de DOPE du conjugué HA-DOPE.

B. Formation des lipoplexes

Les lipoplexes sont obtenus par la mise en contact d'une suspension de liposomes cationiques avec une solution aqueuse de plasmides (Figure 1). Lorsque le conjugué HA-DOPE doit être incorporé à la formulation, celui-ci est ajouté au moment de l'hydratation du film lipidique, c'est-à-dire quand les liposomes se forment. Un effet de complexation est obtenu par ajout de l'ADN aux liposomes cationiques contenant de l'HA-DOPE. Cet effet de complexation, visible par mesure de diamètre, est dû aux interactions des groupements phosphates anioniques du plasmide avec les charges du lipide cationique DE. A *contrario*, cet effet n'existe pas lorsque l'HA libre est ajouté aux liposomes. Le conjugué HA-DOPE ne perturbe pas la formation du complexe, contrairement à l'HA non conjugué. En outre, les complexes L:ADN ne subissent pas de modifications du diamètre moyen sous l'influence d'une osmolarité analogue à celle du sang (NaCl 150 mM, travail master recherche A. Dufaÿ) ou lorsqu'ils sont en présence d'ions divalents tels que le Ca^{2+} ou d'agents chélatants comme l'EDTA (Ca^{2+} 0,15 mM, EDTA 0,5 mM ; testé lors des analyses par diffusion de la lumière en milieu similaire à celui utilisé pour l'incubation des lipoplexes en présence de sérum humain pour réaliser les essais d'activation du complément). Les diamètres moyens obtenus présentent des valeurs de l'ordre de 250 nm, ce qui permet d'envisager une meilleure efficacité de transfection que les lipoplexes de 50 à 100 nm (Felgner *et al.*, 1994). Par analyse

des valeurs de potentiel zêta, il a été montré qu'au moins une partie de l'HA est localisée en surface du système. Cet aspect est un pré-requis à l'adoption d'un caractère furtif des lipoplexes, ainsi qu'à des propriétés de ciblage spécifique. Les valeurs négatives de potentiel zêta limitent fortement les problèmes de toxicité cellulaire rencontrés en présence de charges positives (Senior *et al.*, 1991). De plus, les valeurs obtenues permettent une stabilisation électrostatique du système, ce qui est défavorable aux phénomènes d'agrégation.

C. Association de l'HA-DOPE aux lipoplexes

La quantification de l'HA associé aux lipoplexes, *ie* après ajout du plasmide aux liposomes d'HA, a été envisagée avec le test au carbazole (stage *master of sciences*, Valéria Arietti, 2009) ou par dosage après complexation au CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) (Song *et al.*, 2009). Ces techniques souffrant de nombreuses interférences en présence des lipides ont conduit à des problèmes de détection de l'HA. Une division de l'échantillon par centrifugation aurait pu être envisagée, afin d'effectuer un dosage indirect (Qhattal *et al.*, 2011). Cependant, la détermination de la fraction libre d'HA par la technique d'électrophorèse capillaire a permis d'estimer la fraction d'HA associée aux lipoplexes de rapport L:ADN de 2 tout en évitant de diviser l'échantillon. En limitant les mécanismes de compétition de charges entre l'ADN et l'HA, la conjugaison de la DOPE à l'HA permet de maintenir une quantité d'HA liée aux lipoplexes plus de deux fois supérieure à celle obtenue en présence d'HA libre. Cette quantité d'HA liée représente plus de 40% de la quantité de conjugué introduite lors de la préparation des lipoplexes.

III. Formulation et évaluation de lipoplexes d'HA à l'aide d'un plasmide modèle

A. Caractéristiques physico-chimiques des lipoplexes

Les liposomes cationiques conjugués à l'HA ont été complexés aux plasmides selon différents rapports massiques L:ADN de 1 à 10 avec une masse d'ADN constante (Tableau 1). D'après les analyses d'électrophorèse capillaire, au rapport L:ADN de 2, tout le plasmide est complexé aux liposomes cationiques. A l'exception du rapport L:ADN de 10 (dont les résultats n'ont pas été présentés dans le chapitre 1), les diamètres varient de 250 à 350 nm environ (Tableau 1). Les valeurs de potentiels zêta sont aux alentours de -30 mV jusqu'au rapport L:ADN de 6. La stabilité des interactions au sein des complexes et la fraction d'ADN protégée des dégradations enzymatiques, croît avec l'augmentation du rapport L:ADN (à l'exception des rapports L:ADN de 8 et 10 pour la fraction protégée).

Comme l'ADN est, au moins en partie, localisé en périphérie de la particule de lipoplexe (comme indiqué par les données de diffusion de la lumière), il était indispensable de déterminer la fraction protégée, non dégradée par les nucléases. En effet, seule la fraction d'ADN intacte est responsable de l'activité thérapeutique. Or, pour les trois rapports L:ADN présélectionnés (2, 4 et 6), la quantité d'ADN finale potentiellement active, c'est-à-dire celle disponible et non dégradée par les nucléases dans les conditions testées, est équivalente pour les rapports L:ADN 2, 4 et 6, et représente 1/10 de la quantité totale de l'ensemble du complexe.

B. Efficacité de transfection *in vitro*

Les liposomes cationiques d'HA complexés au plasmide GFP selon les rapports L:ADN de 2, 4 et 6 ont permis une évaluation aisée de leur transfection par simple détection de la fluorescence de la GFP exprimée. La détection de la fluorescence atteste que le plasmide a été à la fois internalisé et exprimé par la cellule. De plus, contrairement au cas d'inclusion de fluorophores, il faut noter qu'aucune modification du complexe n'est susceptible de se produire puisqu'aucun élément nouveau n'est ajouté. L'efficacité de transfection en présence de 0, 10 et 15% d'HA (% exprimé par rapport aux lipides, *ie* pour DE:DOPE:HA-DOPE respectivement 5:5:0, 5:5:1 et 5:5:1,5), conjugué ou non aux lipoplexes, a été mesurée sur les cellules de cancer pulmonaire de la lignée A549 dont plus de 99% expriment CD44. Le rapport L:ADN de 2 contenant 10% d'HA conjugué permet la transfection la plus efficace.

L'expression du gène est d'autant plus importante que les temps d'incubation avec les lipoplexes sont prolongés.

C. Potentiel de furtivité par mesure de l'activation du complément

Vonarbourg *et al.* définissent différents paramètres physico-chimiques capables d'influencer la furtivité des nanovecteurs : la nature des composants, leur diamètre, les charges de surface et l'hydrophilie. Les auteurs ajoutent à cela, les caractéristiques du recouvrement en relevant comme paramètres importants la relation entre le poids moléculaire et la densité de greffage par l'agent apportant la furtivité, et la flexibilité de l'ensemble (Vonarbourg *et al.*, 2006). Les capacités d'apport de furtivité des longues chaînes d'HA sont prometteuses grâce à leur biocompatibilité et leur hydrophilie. De plus, dans le cas des liposomes, une taille importante ne semble pas être un handicap (Vonarbourg *et al.*, 2006). La fraction C3 du complément est fortement impliquée dans le processus d'opsonisation. La détermination du clivage de la fraction C3 est donc un bon marqueur de la possibilité d'opsonisation des nanovecteurs, ce qui conduira à leur capture par le RES. Les trois rapports L:ADN testés, avec ou sans HA-DOPE, ont montré une faible capacité d'activation de la fraction C3 du système du complément après incubation avec du sérum humain (Tableau 1). Malgré une valeur du facteur d'activation du complément plus importante en présence d'HA-DOPE pour le rapport L:ADN de 4 et 6, toutes les formulations sont considérées comme peu activantes dans les conditions testées. La modification du rapport L:ADN a des conséquences sur la densité de greffage, puisque la quantité d'HA-DOPE au sein des complexes augmente en fonction du rapport L:ADN.

Les plasmides amplifiés chez les bactéries comportent de nombreux motifs CpG non méthylés, caractéristiques des génomes bactériens et constituant des PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Ces PAMP sont reconnaissables par les composants du complément, qui sont des PRR (*Pattern Recognition Receptor*) solubles. En général, ces motifs CpG sont responsables de l'apparition de réponse immunitaire, y compris en association avec des lipides cationiques (Yew *et al.*, 2004). La complexation aux lipides semble permettre de cacher les motifs CpG et de ne pas activer le complément. En revanche, il faut souligner une étude reportant que l'ADN peut être considéré comme favorisant l'adsorption de dysopsonines, ce qui est défavorable à une activation du complément (Liu *et al.*, 2010). Par ailleurs, cette étude a été effectuée avec le plasmide GFP présentant un très faible taux d'endotoxines, contrairement aux plasmides préparés au laboratoire. La présence

d'endotoxines augmenterait l'activation du complément (Gewurz *et al.*, 1968). En revanche, il faut souligner que les conditions d'exécution du test d'activation du complément sont drastiques étant donné que nous nous plaçons à des surfaces spécifiques environ cinq fois supérieures à celles retrouvées *in vivo*.

Tableau 1 : Comparaison des résultats de caractérisations de diamètres, potentiels zêta, stabilité des interactions, fraction d'ADN protégé, capacité d'activation du complément et capacité de transfection pour des formulations de lipoplexes contenant 10% de conjugué HA-DOPE et le plasmide GFP selon différents rapports L:ADN.

Lipoplexes GFP de différents rapports L:DNA avec 10% HA-DOPE	1:1	2:1	3:1	4:1	6:1	8:1	10:1
Diamètre (nm)	271 ± 21	266 ± 43	338 ± 22	331 ± 109	259 ± 75	360 ± 156	498 ± 84
Potentiel zêta (mV)	-28 ± 3,8	-28 ± 1,9	-27 ± 3,3	-29 ± 3,7	-27 ± 2,1	-21 ± 2,7	25 ± 6,9
Stabilité des interactions	---	--	-	+	++	+++	
Fraction ADN protégé (%)	3	23	29	55	77	60	54
Facteur d'activation du complément (%)		28 ± 3		37 ± 3	29 ± 3		
Efficacité de transfection (NTEI relatif, fixé à 1 pour rapport 6:1)		4		3,5	1		

D. Mécanisme d'internalisation cellulaire

Le taux de transfection maximal est obtenu dès 6 h d'incubation des lipoplexes de rapport L:ADN de 2 contenant 10% d'HA-DOPE et des cellules A549 exprimant CD44. Dans le modèle cellulaire A549, cela illustre une cinétique d'endocytose plus lente qu'une endocytose dépendante de la voie des clathrines et est compatible avec une internalisation médiée par les cavéoles (Rejman *et al.*, 2005). L'application de différents inhibiteurs de diverses voies d'endocytose a confirmé que les lipoplexes d'HA étaient majoritairement internalisés par la voie des cavéoles. De plus, une part du processus d'endocytose est régie par la reconnaissance du récepteur cellulaire CD44 par le « ligand HA » à la surface des lipoplexes. Dans le cas de la lignée cellulaire de cancer du poumon A549, et du plasmide GFP, ce mécanisme ligand-

récepteur semble être responsable de la transfection des lipoplexes à hauteur d'environ 40%. Pour les cellules de cancer du sein MDA-MB 231, et dans le cas de formulations contenant le plasmide Luc codant pour la luciférase, le blocage du récepteur CD44 par l'utilisation d'anticorps en concentrations croissantes permet d'abolir totalement la transfection (Surace *et al.*, 2009). Ces résultats démontrent la forte spécificité de l'ADN utilisant l'HA comme ligand ciblant le récepteur CD44.

IV. Application à la vectorisation du gène suppresseur de tumeur ER β

A. Comparaison des différents plasmides pour la formulation des lipoplexes

1. Comparaison des plasmides GFP/Luc/ER β

Dans le cas du présent travail, les différences de taille entre les différents types de plasmides utilisés (4, 6 ou 8 kilopaires de bases, Cf. Tableau 2), il faut préciser que nous avons travaillé avec des plasmides obtenus selon deux modes différents de préparation, ce qui modifie leurs caractéristiques : le premier groupe est constitué par les plasmides Luc et ER β et le second groupe par le plasmide GFP (Tableau 2).

Tableau 2 : Comparaison des trois plasmides utilisés.

Plasmide	Luc	ER β	GFP	Conséquences/remarques
Promoteur	CMV			
Taille (pb)	5800	7600	3500	\approx 2 kpb d'écart entre chaque
Mode d'obtention	Préparé au laboratoire, purification par gradient de chlorure de césium		Obtenu par Plasmid Factory [®] , qualité de recherche préclinique	
Pyrogénicité	Taux d'endotoxines ?		1 EU/mg d'ADN	Possibilité d'activation du complément avec Luc et ER β , susceptible d'augmenter l'opsonisation/phagocytose, et de diminuer l'efficacité <i>in vivo</i>
Conformation	50% formes linéaires et 50% formes superenroulées		96% formes superenroulées	Conformation de GFP plus favorable à la transfection
Temps d'hydratation du film lipidique sous agitation mécanique (min)	1	8	8	8 min réduit le diamètre d'environ 100 nm
Temps minimal de complexation L:ADN (min)	30	30	60	GFP : temps doublé pour obtenir des lipoplexes stables (absence de variation du D et du PdI)

Comme rapporté dans le tableau 2, l'augmentation du temps d'hydratation de 7 min entre les lipoplexes préparés avec Luc et ceux avec ER β /GFP a permis de réduire le diamètre d'environ

100 nm. A temps d'hydratation égal (8 min), les formulations obtenues à partir des groupes de plasmides différents (soit ER β et GFP) montrent des valeurs de taille semblables au rapport L:DNA de 2.

Par ailleurs, il faut noter qu'une transfection effectuée avec le plasmide GFP est fortement avantagée en raison de la conformation superenroulée majoritaire et la faible pyrogénicité de GFP par rapport à l'utilisation du premier groupe de plasmides. Enfin, il faut souligner que le temps de complexation a dû être augmenté de 30 minutes dans le cas du plasmide GFP. En effet, le temps habituel ne suffisait pas à obtenir des complexes bien organisés et donc stables. Cette dernière observation peut être expliquée par l'absence de plasmide linéaire, et la présence de formes superenroulées moins flexibles augmentant le temps de réarrangement sous forme de complexes.

2. Comparaison des lipoplexes de rapport lipides:ADN de 2

L'impact du type de plasmide sur les caractéristiques physico-chimiques des lipoplexes peut donc être étudié (Figure 3).

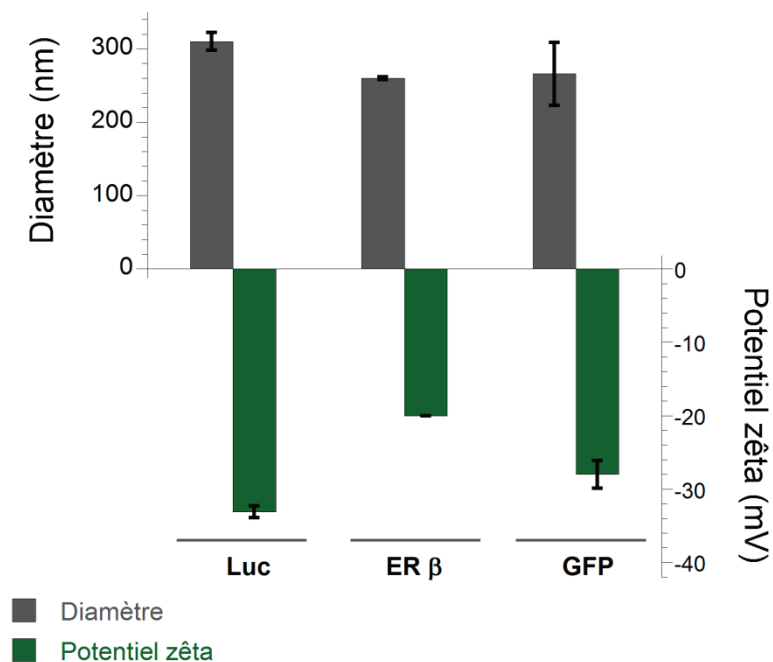


Figure 3: Comparaison des valeurs de diamètres et de potentiels zêta de lipoplexes comportant 10% d'HA-DOPE et contenant les plasmides Luc, ER β ou GFP, selon un rapport L:ADN de 2.

Le raisonnement en rapports massiques L:ADN, permet de se placer à quantité égale en groupements phosphates quelque soit le plasmide introduit dans la formulation. Cependant, les valeurs de potentiel zêta des lipoplexes de ER β varient d'environ 10 mV, comparé à Luc

et GFP. La répartition de l'ADN au sein du lipoplexe pourrait donc être différente : il y a moins de plasmide ER β en surface. Or pour le rapport L:ADN de 2, la fraction protégée des nucléases est de $30 \pm 16\%$ du plasmide ER β total complexé en PCR et de 23% par migration sur gel avec le plasmide GFP. Bien que présentant le même ordre de grandeur, ces résultats semblent montrer qu'ER β est moins dégradé en raison de sa localisation.

Par ailleurs, en l'absence d'HA-DOPE, la fraction non digérée est de $40 \pm 8\%$ pour le rapport L:ADN de 2. Une plus grande fraction d'ADN est digérée lorsque le conjugué HA-DOPE est présent dans la formulation. Deux hypothèses peuvent être proposées : ce complexe ternaire lipides/ADN/HA-DOPE pourrait être plus relâché que le complexe binaire lipides/ADN, ce qui augmenterait les voies d'entrée aux enzymes ; le conjugué HA-DOPE ajouté pendant l'hydratation du film lipidique (avant l'ADN), expose davantage l'ADN en périphérie de la structure en le rendant plus sensible aux dégradations enzymatiques.

B. Efficacité de transfection du gène ER β *in vitro*

Contrairement à l'évaluation directe de la validité des constructions plasmidiques Luc et GFP (respectivement, production de lumière en présence de luciférine, production de fluorescence verte), la validité de la construction plasmidique ER β et la conservation de son activité après complexation aux liposomes cationiques ont été vérifiées par détection des effets répressifs de ER β sur ER α . La protéine codée par le plasmide ER β utilisé dans nos études, a montré des effets comparables à ceux décrits dans la littérature lors de l'utilisation d' « éléments de réponse aux ER » (ERE et AP-1, activées par l'homodimère ER α /ER α et réprimées par l'hétérodimère ER α /ER β). Ainsi l'activité dominante négative de ER β sur ER α a été relevée, montrant la validité de la construction plasmidique employée, ainsi que la conservation de son activité après complexation aux liposomes cationiques. *In vitro*, le seuil tolérable de viabilité cellulaire des formulations de lipoplexes, fixé à 80%, est atteint pour 10 μ g de lipoplexes par volume de milieu de culture (1 mL). Les effets des lipoplexes sur la viabilité des cellules sont indépendants de la nature du plasmide, du type de rapport, de la présence d'HA-DOPE et de la lignée cellulaire employée (MCF-7 Zs green, MDA-MB231, MCF-7 RU et A549). Trois lignées cellulaires humaines de cancer du sein ont été caractérisées par PCR, western blot et cytométrie de flux. La lignée MCF-7 IAL a été choisie comme modèle d'étude. Elle représente le meilleur compromis du point de vue de l'expression à la fois du récepteur membranaire CD44 (cible membranaire) et du récepteur des estrogènes ER α (cible pharmacologique). Les lipoplexes de ER β contenant 10% d'HA-DOPE induisent une bonne

transfection du gène puisqu'il a pu être transcrit. La présence de 10% de sérum dans le milieu de culture n'inhibe pas la transfection des lipoplexes de ER β , contrairement à ce qui peut être constaté avec d'autres lipoplexes de tailles inférieures à 250 nm en général (Turek *et al.*, 2000).

C. Activité antitumorale sur un modèle de xénogreffe

L'ensemble des tests *in vitro* montre que la formulation optimale est le rapport L:ADN de 2 contenant 10% d'HA-DOPE. C'est donc cette formulation qui a été tout naturellement choisie pour être testée *in vivo*. Au bout de six semaines de traitement par les lipoplexes conjugués à l'HA, les volumes tumoraux mesurés chez la souris sont de 40% inférieurs à ceux résultants des autres traitements (lipoplexes sans HA-DOPE ou sans la séquence codante pour la protéine d'intérêt thérapeutique), dont les valeurs sont comparables au lot non traité. L'apport d'efficacité *in vivo* par la présence d'HA dans la formulation est indéniable. Les analyses immunohistologiques sont en accord avec ces observations puisque l'indice de prolifération Ki67 régresse pour les tumeurs traitées par les lipoplexes de ER β avec HA-DOPE. Cette efficacité, combinée à l'inefficacité de la formulation de lipoplexes de ER β sans HA-DOPE, peut être attribuée à une modification de la biodistribution du vecteur autorisant un ciblage tumoral par acquisition d'un caractère furtif et/ou d'une capacité de ciblage actif du récepteur CD44 exprimés par les cellules de la tumeur. Cette démarche de thérapie génique visant à rétablir l'orientation de la balance d'expression de ER α et de ER β en faveur de ce dernier, afin de mettre en avant ses effets anti prolifératifs, a été possible grâce à l'utilisation des lipoplexes que nous avons développés. La faisabilité d'une démarche de thérapie génique intraveineuse *via* les lipoplexes d'HA-DOPE a ainsi été montrée. De même, nous apportons un élément de plus en faveur du rôle suppresseur de tumeur de ER β .

Par ailleurs, la présence d'HA de haut poids moléculaire n'a pas d'action délétère visible par activation de CD44, étant donné que les analyses immunohistologiques d'expression du marqueur de néovasularisation CD34 du lot traité par des lipoplexes de pcDNA3 contenant l'HA-DOPE ne montrent pas de différence avec d'une part le lot non traité, et d'autre part le lot traité par les lipoplexes de ER β sans conjugué HA-DOPE. Cet aspect est cohérent avec le fait que l'HA de haut poids moléculaire n'a pas d'action pro-angiogénique, contrairement aux fragments d'HA de bas poids moléculaire.

La furtivité *in vitro* de la formulation de lipoplexes sans HA-DOPE (bien que ceci n'ait été testé qu'avec un plasmide de faible pyrogénicité) permet d'attribuer le gain d'efficacité à l'existence d'un ciblage actif. Il a autorisé une transfection de cellules beaucoup plus directives sur l'évolution de la croissance tumorale. L'hypothèse que le conjugué HA-DOPE a pu permettre la sélection de cellules stratégiques exprimant CD44, les CSC, est avancée.

Peu d'études concernant des lipoplexes, à visée anticancéreuse, par voie intraveineuse, et présentant une circulation prolongée dans le compartiment plasmatique et/ou des capacités de ciblage actif sont disponibles. Cependant, Niu *et al.*, 2011 ont observé une régression des volumes de xénogreffes sous cutanées de gliome humain, après injection intraveineuse aux souris, de lipoplexes recouverts de PEG2000 et fonctionnalisés par le peptide bFGF (*basal fibroblast growth factor* ou FGF2) qui contiennent un gène codant pour une protéine inductrice de l'apoptose. Après deux injections, les analyses de sang pratiquées sur les animaux ne montrent pas de variation des paramètres sanguins par rapport à des souris non traitées, ce qui témoigne, dans ces conditions, d'une absence de toxicité (Niu *et al.*, 2011). Les essais *in vitro* confirment que la présence de PEG réduit la transfection des cellules par rapport à l'utilisation de lipoplexes nus. Les essais *in vitro* et *in vivo* montrent un gain d'efficacité grâce à la fonctionnalisation des lipoplexes mais celui-ci est toutefois négligeable par rapport aux lipoplexes nus qui induisent également une régression des tumeurs, contrairement à ce que nous avons constaté. Alors que les tailles sont similaires, les différences de charges de surface entre leur système (aux alentours de + 30 mV pour les lipoplexes nus) et celui présenté dans ce travail, pourraient induire des interactions très différentes avec les éléments plasmatiques et modifier ainsi l'accumulation au niveau de la tumeur. En revanche, Eliyahu *et al.*, ont étudié la biodistribution de lipoplexes de DOTAP:Cholestérol (1:1 mol:mol) contenant un plasmide Luc (ZP = + 30 mV) après injection intraveineuse *via* la veine de la queue de souris sans tumeur. Après 24 h, la majorité des lipoplexes cationiques est retrouvée dans la queue, puis dans les poumons, le système gastro-intestinal, le foie, la rate et le cœur (ordre décroissant basé sur un pourcentage par rapport à la dose injectée par mg de tissu) (Eliyahu *et al.*, 2007). De plus, la présence de charges positives peut être responsable d'effets toxiques (Senior *et al.*, 1991) et d'accumulation au niveau pulmonaire (Anwer *et al.*, 2000). C'est pourquoi, les lipoplexes conjugués à l'HA, qui présentent de façon atypique des charges de surface négatives, demeurent d'un grand intérêt.

V. Conclusion

Le vecteur ciblé de thérapie génique anticancéreuse, développé au cours de ce travail, présente un ensemble de caractéristiques résumées ci-dessous (Figure 4), lui permettant de pouvoir contourner ou atténuer, voire vaincre, les obstacles rencontrés lors de l'administration d'un gène par voie intraveineuse.

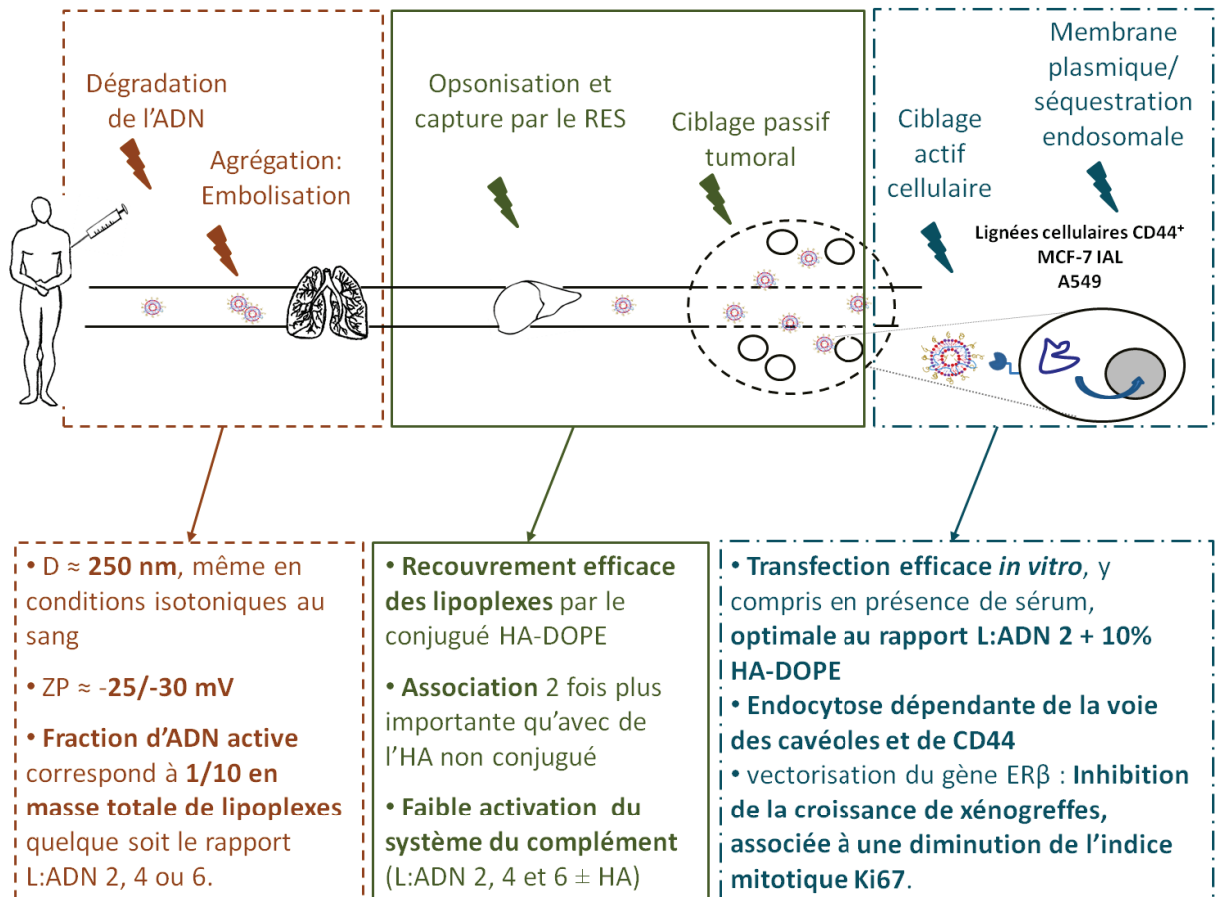


Figure 4 : Résumé des différents obstacles qu'un vecteur de thérapie génique doit franchir par voie intraveineuse (partie supérieure) et apports des lipoplexes développés (partie inférieure).

L'intérêt de la conjugaison d'HA à des lipoplexes a été démontrée, tant en termes de pourcentage d'association de l'HA et de maintien de l'effet de complexation lors de l'ajout de l'ADN, qu'en termes d'efficacité de transfection sur une lignée cellulaire de cancer du poumon *in vitro* (chapitre 1), ou de cancer du sein *in vitro* (Surace *et al.*, 2009), et *in vivo* (chapitre 2).

VI. Perspectives

Des caractérisations plus approfondies du recouvrement des lipoplexes par l'HA pourraient être entreprises. Il a été montré par analyse des valeurs de potentiel zêta qu'une fraction d'HA était localisée en surface du système ; la fraction totale associée aux lipoplexes a elle été estimée par électrophorèse capillaire. Il serait utile de pouvoir distinguer au sein de la fraction dite associée, la part associée en surface, de celle associée mais tournée vers la cavité interne du lipoplexe. Cette dernière est inefficace en termes d'apport de furtivité et de ciblage cellulaire. Ainsi, une mesure de la fraction d'HA associée mais interne pourrait être faite par analyse d'une suspension de lipoplexes qui aurait été préalablement exposée à une digestion par une hyaluronidase. L'accès à la fraction à la fois associée et externe serait ainsi possible. En outre, nous avons avancé dans cette discussion une hypothèse sur le mode de distribution des chaînes d'HA, celle-ci demeure à confirmer afin de définir la conformation exacte des chaînes. De même, la structure du système pourrait être mieux comprise au travers d'expérience

Par ailleurs, la biodistribution des lipoplexes est à étudier afin de démontrer l'apport du conjugué HA-DOPE en terme de ciblage tumoral. Ainsi, la recherche de l'expression de notre gène dans le foie et les poumons notamment est indispensable. Des preuves directes *in vivo* de la transfection de ER β restent encore à être apportées. En effet, pour le moment seules des preuves indirectes de la réussite de la transfection, telles que la régression du volume des tumeurs et la diminution de l'indice mitotique Ki67, ont été apportées. Des études prometteuses par PCR ont montré la présence de l'ARNm de ER β dans quelques tumeurs, mais l'étude doit être répétée.

Notre travail a été réalisé sur des lignées exprimant CD44 mais qui ne sont pas des cellules souches. Un long chemin s'ouvre à présent afin d'apporter des preuves en faveur des théories de Reya (Reya *et al.*, 2001), puis Wicha (Wicha *et al.*, 2006) annonçant que des agents thérapeutiques ciblant les CSC pourraient entraîner la dégénérescence de la tumeur par leur simple disparition. L'expérimentation de notre formulation au sein d'un modèle mimant au plus près une tumeur développée et entretenue par l'existence de CSC pourrait répondre à ces hypothèses. Dans un second temps, l'étude de notre système dans un modèle comportant des métastases pourrait montrer les potentialités de notre formulation sur les mCSC.

L'approche de thérapie génique par l'apport de ER β pourrait être renforcée par une co-administration, au sein de la même formulation ou en parallèle, avec une formulation de siRNA dirigés contre ER α (Bouclier *et al.*, 2010). Les liposomes cationiques peuvent

complexer de l'ADN, c'est le propos de cette thèse, mais également des siRNA (Taetz *et al.*, 2009). Nous pourrions étudier la faisabilité d'un complexe de liposomes cationiques avec, à la fois, l'ADN et les siRNA. Cette approche est particulièrement intéressante dans les problématiques mettant en jeu des balances de régulation telles que ER α /ER β . Par ailleurs, ER β étant présent dans d'autres tissus de l'organisme, ses potentialités thérapeutiques permettent d'envisager une application dans le cancer de la prostate, les maladies autoimmunes, le cancer du colon, les tumeurs neurodégénératives, ou encore dans le cancer des ovaires (Koehler *et al.*, 2005; Lazennec 2006; Warner *et al.*, 2010).

Cette formulation de lipoplexes peut également être envisagée pour la vectorisation d'un autre gène. Le choix du plasmide devra prendre en compte la relation entre le gène vectorisé et les CSC ciblées par le nanovecteur, afin d'obtenir une action thérapeutique efficace. De même, la stratégie autour de ER β peut être améliorée par l'utilisation d'un plasmide codant pour la forme de ER β mutée en sérine 87. En effet, cette forme mutée permet de bloquer la dégradation de la protéine ER β par le protéasome et donc permet un maintien de son activité¹.

¹ Il existe une boucle de régulation positive entre l'activité de ER et la voie nommée CXCR4/SDF-1. De forts taux d'expression de SDF-1 (*Stromal cell Derived Factor*) et de son unique récepteur CXCR4 sont corrélés à des phénotypes agressifs de cancers (Kucia *et al.*, 2005). Le couple CXCR4/SDF-1 entraîne une augmentation de la phosphorylation de la sérine 87 du domaine AF-1 de ER β , qui est cependant associée à une dégradation accélérée de ER β par le protéasome. Ainsi la sérine 87 peut être considéré comme un élément clé de régulation de la voie CXCR4/SDF-1 (Sauve *et al.*, 2009). L'axe CXCR4-SDF-1 serait également le régulateur principal du trafic des cellules souches normales et cancéreuses lui affectant alors des rôles dans l'organogénèse et la régénération tissulaire, mais aussi dans l'initiation de métastases (Kucia *et al.*, 2005). C'est pourquoi, cet axe critique, mais sensible, ne doit pas constituer une cible thérapeutique directe : on s'exposerait à de nombreux effets secondaires tant le champ d'action de l'axe CXCR4-SDF-1 est large. Ainsi une réponse plus spécifique, prenant en compte les effets néfastes de l'axe CXCR4-SDF1, serait de vectoriser la forme mutée de ER β sur la sérine 87 (à condition que la dominance négative ER β sur ER α soit conservée). La forme mutée rend ainsi impossible la phosphorylation de la sérine 87 et abolit l'axe CXCR4/SDF-1. L'effet de notre gène n'en est que plus renforcé, puisque la dégradation protéasome dépendante de ER β par l'activation de SDF-1 ne se déroule plus et la protéine n'est plus dégradée par cette voie, il y a donc maintien de son activité.

Anwer K, Meaney C, Kao G, Hussain N, Shelvin R, Earls RM, Leonard P, Quezada A, Rolland AP and Sullivan SM (2000). "Cationic lipid-based delivery system for systemic cancer gene therapy." Cancer Gene Ther **7**(8): 1156-1164.

Arpicco S, Canevari S, Ceruti M, Galmozzi E, Rocco F and Cattel L (2004). "Synthesis, characterization and transfection activity of new saturated and unsaturated cationic lipids." Farmaco **59**(11): 869-878.

Bally MB, Harvie P, Wong FM, Kong S, Wasan EK and Reimer DL (1999). "Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers." Adv Drug Deliv Rev **38**(3): 291-315.

Bouclier C, Marsaud V, Bawa O, Nicolas V, Moine L, Opolon P and Renoir JM (2010). "Coadministration of nanosystems of short silencing RNAs targeting oestrogen receptor alpha and anti-oestrogen synergistically induces tumour growth inhibition in human breast cancer xenografts." Breast Cancer Res Treat **122**(1): 145-158.

De Rosa G, De Stefano D, Laguardia V, Arpicco S, Simeon V, Carnuccio R and Fattal E (2008). "Novel cationic liposome formulation for the delivery of an oligonucleotide decoy to NF-kappaB into activated macrophages." Eur J Pharm Biopharm **70**(1): 7-18.

Eliyahu H, Joseph A, Schillemans JP, Azzam T, Domb AJ and Barenholz Y (2007). "Characterization and in vivo performance of dextran-spermine polyplexes and DOTAP/cholesterol lipoplexes administered locally and systemically." Biomaterials **28**(14): 2339-2349.

Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M and Felgner PL (1994). "Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations." J Biol Chem **269**(4): 2550-2561.

Gewurz H, Mergenhagen SE, Nowotny A and Phillips JK (1968). "Interactions of the complement system with native and chemically modified endotoxins." J Bacteriol **95**(2): 397-405.

Hartman J, Lindberg K, Morani A, Inzunza J, Strom A and Gustafsson JA (2006). "Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts." Cancer Res **66**(23): 11207-11213.

Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M and Gustafsson JA (2005). "Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta." Endocr Rev **26**(3): 465-478.

Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J and Ratajczak MZ (2005). "Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis." Stem Cells **23**(7): 879-894.

Lazennec G (2006). "Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis." Cancer Lett **231**(2): 151-157.

Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C and Vignon F (2001). "ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells." Endocrinology **142**(9): 4120-4130.

Liu F, Frick A, Yuan X and Huang L (2010). "Dysopsonin activity of serum DNA-binding proteins favorable for gene delivery." J Pharmacol Exp Ther **332**(2): 500-504.

Mizrahy S, Raz SR, Hasgaard M, Liu H, Soffer-Tsur N, Cohen K, Dvash R, Landsman-Milo D, Bremer MG, Moghimi SM and Peer D (2011). "Hyaluronan-coated nanoparticles: The influence of the molecular weight on CD44-hyaluronan interactions and on the immune response." J Control Release.

Niu G, Driessen WH, Sullivan SM and Hughes JA (2011). "In vivo anti-tumor effect of expressing p14ARF-TAT using a FGF2-targeted cationic lipid vector." Pharm Res **28**(4): 720-730.

Paruthiyil S, Cvorro A, Tagliaferri M, Cohen I, Shtivelman E and Leitman DC (2011). "Estrogen receptor beta causes a G2 cell cycle arrest by inhibiting CDK1 activity through the regulation of cyclin B1, GADD45A, and BTG2." Breast Cancer Res Treat **129**(3): 777-784.

Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL and Leitman DC (2004). "Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest." Cancer Res **64**(1): 423-428.

Peer D and Margalit R (2004). "Loading mitomycin C inside long circulating hyaluronan targeted nano-liposomes increases its antitumor activity in three mice tumor models." Int J Cancer **108**(5): 780-789.

Peer D and Margalit R (2004). "Tumor-targeted hyaluronan nanoliposomes increase the antitumor activity of liposomal Doxorubicin in syngeneic and human xenograft mouse tumor models." Neoplasia **6**(4): 343-353.

Qhattal HS and Liu X (2011). "Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes." Mol Pharm **8**(4): 1233-1246.

Rejman J, Bragonzi A and Conese M (2005). "Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes." Mol Ther **12**(3): 468-474.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.

Sauve K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N and Tremblay A (2009). "Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway." Cancer Res **69**(14): 5793-5800.

Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C and Gregoriadis G (1991). "Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles." Biochim Biophys Acta **1062**(1): 77-82.

Senior JH, Trimble KR and Maskiewicz R (1991). "Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application in vivo." Biochim Biophys Acta **1070**(1): 173-179.

Shi F, Wasungu L, Nomden A, Stuart MC, Polushkin E, Engberts JB and Hoekstra D (2002). "Interference of poly(ethylene glycol)-lipid analogues with cationic-lipid-mediated delivery of oligonucleotides; role of lipid exchangeability and non-lamellar transitions." Biochem J **366**(Pt 1): 333-341.

Song JM, Im JH, Kang JH and Kang DJ (2009). "A simple method for hyaluronic acid quantification in culture broth." Carbohydrate Polymers **78**(3): 633-634.

Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J and Gustafsson JA (2004). "Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(6): 1566-1571.

Surace C, Arpicco S, Dufay-Wojcicki A, Marsaud V, Bouclier C, Clay D, Cattel L, Renoir JM and Fattal E (2009). "Lipoplexes targeting the CD44 hyaluronic acid receptor for efficient transfection of breast cancer cells." Mol Pharm **6**(4): 1062-1073.

Taetz S, Bochot A, Surace C, Arpicco S, Renoir JM, Schaefer UF, Marsaud V, Kerdine-Roemer S, Lehr CM and Fattal E (2009). "Hyaluronic acid-modified DOTAP/DOPE liposomes for the targeted delivery of anti-telomerase siRNA to CD44-expressing lung cancer cells." Oligonucleotides **19**(2): 103-116.

Treeck O, Lattrich C, Springwald A and Ortmann O (2009). "Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells." Breast Cancer Res Treat.

Turek J, Dubertret C, Jaslin G, Antonakis K, Scherman D and Pitard B (2000). "Formulations which increase the size of lipoplexes prevent serum-associated inhibition of transfection." J Gene Med **2**(1): 32-40.

Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P and Benoit JP (2006). "Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems." Biomaterials **27**(24): 4356-4373.

Warner M and Gustafsson JA (2010). "The role of estrogen receptor beta (ERbeta) in malignant diseases--a new potential target for antiproliferative drugs in prevention and treatment of cancer." Biochem Biophys Res Commun **396**(1): 63-66.

Wicha MS, Liu S and Dontu G (2006). "Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift." Cancer Res **66**(4): 1883-1890; discussion 1895-1886.

Yew NS and Cheng SH (2004). "Reducing the immunostimulatory activity of CpG-containing plasmid DNA vectors for non-viral gene therapy." Expert Opin Drug Deliv **1**(1): 115-125.

◆ Résumé :

L'administration intraveineuse d'ADN thérapeutique rencontre de nombreux obstacles liés à sa dégradabilité, ainsi qu'à sa difficulté à pénétrer les cellules en raison de sa taille importante et de son hydrophilie. Des lipoplexes conjugués à de l'acide hyaluronique (HA) de haut poids moléculaire ont été développés afin de délivrer de l'ADN plasmidique à l'intérieur de cellules cancéreuses exprimant le récepteur membranaire CD44, récepteur clé du développement tumoral. L'emploi d'HA conjugué au phospholipide DOPE (HA-DOPE) et d'un plasmide modèle GFP a permis d'obtenir des lipoplexes d'environ 250 nm, chargés négativement, protégeant efficacement l'ADN contre les nucléases et activant peu la fraction C3 du système du complément. Dans un modèle cellulaire exprimant CD44, la transfection optimale a été obtenue par l'utilisation de lipides avec 10% d'HA-DOPE complexés à de l'ADN selon un rapport 2:1. Ces lipoplexes sont internalisés par la voie des cavéoles et de façon dépendante du récepteur CD44. Cette formulation a été appliquée à la vectorisation d'un gène thérapeutique, codant pour le récepteur des estrogènes β (ER β), qui est un potentiel suppresseur de tumeur. Sur un modèle *in vivo* de xénogreffes de cellules humaines de cancer du sein estrogéno-dépendant et exprimant CD44, la diminution du volume tumoral, ainsi que de l'indice de prolifération Ki67 ont permis de montrer l'effet anticancéreux par voie intraveineuse des lipoplexes conjugués à l'HA.

◆ Mots clés :

lipoplexes, thérapie génique, acide hyaluronique, cancer, voie intraveineuse

◆ Laboratoire de rattachement :

UMR CNRS 8612
Institut Galien Paris-Sud
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex