

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE NANOPARTICULES FOLATE-
CHITOSAN-ADN POUR LA THÉRAPIE GÉNIQUE

SANIA MANSOURI
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
Décembre 2004



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-494-01363-X

Our file Notre référence

ISBN: 0-494-01363-X

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE NANOPARTICULES FOLATE-
CHITOSAN-ADN POUR LA THÉRAPIE GÉNIQUE

Présenté par : MANSOURI Sania

En vue de l'obtention du diplôme de : maîtrise ès sciences appliquées

A été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. LEBLANC Robert, D.Sc.A., président

M. SAVARD Pierre, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. FERNANDES Julio, MD, M.Sc.A., membre et codirecteur de recherche

MME WINNIK Françoise, Ph.D., membre

À mes parents,

Remerciements

Mes premiers remerciements iront à mon directeur le Dr Julio Fernandes, qui a accepté d'encadrer cette maîtrise et qui m'a témoigné son soutien, son encouragement et sa confiance. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères gratitude. Je tiens à le remercier de m'avoir accueillie au sein de son groupe, encouragée et poussée à présenter à différents congrès et journées de recherche. Au cours de ces années, il a fait preuve d'une patience et d'une grande attention pour ce travail. Les nombreuses discussions et les conseils qu'il m'a donnés, ont été primordiaux pour la réalisation de ce travail. Je voudrais remercier Dr Pierre Savard pour son aide, son soutien ainsi que son encouragement.

Ce travail n'aurait jamais pu aboutir sans l'aide de la professeure Françoise M. Winnik et de ses étudiants, surtout Yan Cuie et Charbel Diab, qui ont toujours su me consacrer un peu de leur temps, me guider et me conseiller au niveau des synthèses chimiques.

Je voudrais remercier tous les membres du laboratoire de recherche en orthopédie du centre de recherche de l'hôpital du Sacré Cœur, Shi Qin, Mohamed Benderdour, Patrick Lavigne, Clemente Lacerda, Barbara Morquette pour leur soutien et leur amitié. Un remerciement tout particulier à Mohamed Benderdour qui m'a communiqué une partie de son expérience et qui m'a encouragé tout au long de ma maîtrise. Un remerciement

particulier à Shi pour ses conseils techniques apportés tout au long de ma maîtrise et à Patrick pour la lecture et correction des mes résumés et articles.

Je tiens à remercier tous les membres de l'IGB pour leur support et les bons moments passés ensemble particulièrement Susan K. Tam pour son encouragement et pour son aide au niveau des corrections linguistiques et bien sure pour son amitié. Ma gratitude va aussi à Kaouthar Saïdane pour son support, son encouragement et son amitié.

De même, je tiens à remercier Karin Corsi pour son aide et ses conseils éclairés au début de ma maîtrise et pour son encouragement.

J'adresse mes sincères remerciements à l'unité de recherche en arthrose du CHUM de l'hôpital de Notre-Dame pour leur support et encouragement. À Mme Ginette Tardif pour son aide et sa disponibilité au début de ma maîtrise.

Ce projet de maîtrise a été réalisé grâce au fond de recherche de NanoQuébec, et aussi à la bourse que j'ai obtenu du programme MENTOR. Je remercie aussi Nathalie Jourdain pour son humanisme et son soutien aux moments les plus difficiles.

J'exprime ma sincère reconnaissance aux membres du jury, M. A.-Robert LeBlanc, président et professeure Françoise Winnik d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je finis cette page de remerciement en ayant une pensée pour ma famille et mes amis de m'avoir soutenu et aidé tout au long de cette maîtrise.

Résumé

La thérapie génique consiste en l'utilisation de vecteurs pour transporter un gène dans les cellules. Les vecteurs peuvent être viraux ou non-viraux. Ils doivent permettre le transport d'un gène dans les cellules sans que ce dernier ne soit dégradé et ainsi permettre son expression. Les vecteurs viraux présentent une bonne efficacité de transfection des gènes mais ils peuvent s'avérer immunogéniques et peuvent générer des mutations géniques non contrôlables pouvant mener à la mort du patient. Les vecteurs non-viraux à base de polymères cationiques tels que le chitosan ont la capacité de se complexer avec l'ADN et de le condenser. Le chitosan protège l'ADN complexé contre la dégradation par des nucléases *in vivo*, ce qui permet à l'ADN d'atteindre sa cible. Le chitosan a une bonne biocompatibilité mais possède une faible efficacité de transfection. Une stratégie pour améliorer le taux de transfection est de tirer profit du mécanisme de l'internalisation de l'acide folique (Fa) par des cellules pour cibler spécifiquement ces cellules. L'objectif de cette étude est de synthétiser et caractériser les nouvelles nanoparticules Fa-chitosan-ADN et d'évaluer leur cytotoxicité *in vitro*.

L'acide folique est conjugué au chitosan par amidation réductive. Les nanoparticules chitosan-ADN et Fa-chitosan-ADN ont été préparés en utilisant un processus complexe de coacervation. L'effet du rapport de charge sur des propriétés des nanoparticules chitosan-ADN et Fa-chitosan-ADN a été réalisé par le Malvern Zetasizer 4. Le ratio de

charge (N/P) contrôle la taille de nanoparticules et leur potentiel zêta. Les nanoparticules ont une taille moyenne près de 118nm et un potentiel zêta positif. Ce sont deux caractéristiques importantes pour permettre une bonne interaction avec les cellules et permettre ainsi leur internalisation.

L'effet des nanoparticules sur la viabilité de cellules a été analysé avec le dosage de bromure du tétrazolium 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl (MTT) sur les cellules embryonnaires rénales humaines (HEK293). Les analyses de cytotoxicité ont démontré une viabilité cellulaire à 80% avec les nanoparticules de chitosan-ADN et Fa-chitosan-ADN comparativement à 30 % de survie cellulaire avec la LipofectAMINETM2000. Ceci confirme la faible cytotoxicité des nanoparticules, même lorsque conjugué à l'acide folique.

L'inclusion et l'intégrité de l'ADN dans les nanoparticules ont été évaluées sur un gel d'électrophorèse. Les nanoparticules chitosan-ADN et Fa-chitosan-ADN ont été digérées avec des enzymes tels que le chitosanase et le lysozyme. Des échantillons de nanoparticules d'ADN, non digérés et digérée ont été chargés sur un gel 0.8% d'agarose. Les résultats du gel de l'électrophorèse montre que l'ADN reste intacte dans les complexes chitosan. De plus ce test a confirmé la complexation de l'ADN au chitosan et Fa-chitosan. Encore une fois, l'acide folique n'affecte pas la complexation et la condensation de l'ADN et l'ADN libéré reste intact.

Pour conclure, nous sommes la première équipe qui synthétise des nanoparticules Fa-chitosan-ADN pour la thérapie génique. Les nanoparticules de Fa ont une faible cytotoxicité, une bonne condensation d'ADN, un potentiel zêta positif et une dimension particulaire autour de 118 nm. Toutes ces caractéristiques font des nanoparticules Fa-chitosan-ADN un candidat prometteur pour la thérapie génique non-virale.

Abstract

Gene therapy involves the use of carriers to deliver gene into cells. The vectors can be viral or non-viral. The vector role is to transport gene into cells without DNA degradation and thus allow its expression. Viral vectors have good gene transfection effectiveness but they can be immunogenic and can generate uncontrollable oncogenic mutations. Non-viral vectors made of cationic polymers such as chitosan have the capability to be complexed with DNA and to condense it. Chitosan protects complexed DNA against degradation by nucleases *in vivo*, which will make it possible for the DNA to reach its target. Chitosan has a good biocompatibility but has a low transfection effectiveness. A strategy to improve the transfection rate is to use from the mechanism of folic acid (Fa) internalization by cells to target specific cells. The objective of this study is to synthesize and characterize new Fa-chitosan-DNA nanoparticles and to evaluate their cytotoxicity *in vitro*.

Folic acid is conjugated with chitosan by reductive amidation. Chitosan-DNA and Fa-chitosan-DNA nanoparticles were prepared using a complex coacervation process. The charge ratio (N/P) effect on chitosan-DNA and F-chitosan-DNA nanoparticles properties was carried out using a Malvern Zetasizer 4. The charge ratio (N/P) controlled the nanoparticles size and their zeta potential. Nanoparticles have an average size close to

118 nm and a positive zeta potential. These are two important characteristics that allow a good interaction with cells as well as their internalization.

The effect of nanoparticles on cells viability was analyzed with the bromide tetrazolium 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl (MTT) test on embryonic renal human cells (HEK293). The cytotoxicity analysis showed a cellular viability of 80% with chitosan-DNA and Fa-chitosan-DNA nanoparticles compared to 30% of cellular viability with LipofectAMINE2000. That confirms the relatively weak cytotoxicity of these nanoparticles, even when conjugated with folic acid.

DNA inclusion and integrity in the nanoparticles were evaluated by electrophoresis gel. Chitosan-DNA and Fa-chitosan-DNA nanoparticles were digested with chitosanase and the lysozyme. Nanoparticles samples, not digested and digested were charged on a 0.8% agarose gel. Ethidium bromide staining results shows that DNA remains intact after digestion. Moreover this test confirmed DNA complexation to chitosan and Fa-chitosan. Once again, folic acid does not affect the DNA complexation and condensation and the released DNA remains intact.

In summary, we are the first team to report the synthesis of FA-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. The nanoparticles have a weak cytotoxicity, a good DNA condensation, a positive zeta potential and a particulate dimension around 118 nm. All these characteristics make the Fa-chitosan-DNA nanoparticles a promising candidate for the non-viral gene therapy.

Table des matières

DÉDICACE.....	iv
REMERCIEMENTS.....	v
RÉSUMÉ.....	viii
ABSTRACT.....	xi
TABLE DES MATIÈRES.....	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xvii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xix
 CHAPITRE 1. INTRODUCTION	 1
 CHAPITRE 2. OBJECTIFS ET HYPOTHESES	 8
2.1. Objectif général	8
2.2. Objectifs et hypothèses secondaires.....	8
 CHAPITRE 3. ÉTAT DES CONNAISSANCES	 11
3.1. Thérapie génique.....	11
3.1.1. Application de la thérapie génique	13
3.2. Vecteurs en thérapie génique	16
3.2.1. L'injection directe de l'ADN seul.....	16

3.2.2. Les vecteurs viraux	17
3.2.3. Les vecteurs non-viraux	18
3.2.3.1. Les lipides cationiques	19
3.2.3.2. Des polymères cationiques	21
3.3. L'acide folique	22
3.4. Chitosan	25
3.5. Des stratégies pour améliorer l'efficacité de transfection génique	27
3.5.1. Chitosans modifiés pour la thérapie génique	27
3.5.1.1. Chitosan lactosylé	27
3.5.1.2. Le chitosan galactosylé greffé avec le polyéthylène glycol (GCP)	28
3.5.1.3. Quaternization de l'oligomère de chitosan	28
3.5.1.4. Les complexes de chitosan/ADN/ligand	29
3.5.1.5. Vecteur de chitosan modifié avec l'acide deoxycholique	31
3.5.1.6. Le liposome dans une microsphère de chitosan	31
3.6. Applications cliniques potentiels	32
3.6.1. L'immunisation génétique mucoale	32
3.6.2. La livraison pulmonaire de gène	33
3.6.3. L'utilisation de l'acide folique pour cibler les cellules cancéreuses	34
CHAPITRE 4. MATERIELS ET METHODES	37
4.1. Conjugaison de l'acide folique au chitosan	37
4.1.1. La solution de chitosan 0.1% (p/v)	37

4.1.2. Préparation de la solution tampon phosphate 0.05M.....	38
4.1.3. Conjugaison de l'acide folique au chitosan	38
4.2. Synthèse des complexes chitosan-ADN et folate-chitosan-ADN	41
4.2.1. Préparation des solutions de chitosan et folate-chitosan 0.1% p/v	41
4.2.2. Isolation de l'ADN plasmidique	41
4.2.3. Préparation de l'ADN plasmidique pour la complexation avec le chitosan et Fa-chitosan.....	42
4.2.4. Préparation des complexes de chitosan-ADN et de folate-chitosan-ADN	42
4.3. Évaluation de l'intégrité de l'ADN plasmidique suite à la synthèse	43
4.4. Études de caractérisations	44
4.4.1. L'effet du ratio de charge N/P sur des propriétés des nanoparticules chitosan- ADN et Fa-chitosan-ADN	44
4.5. Études de cytotoxicité	44
4.5.1. Matériel	44
4.5.2. Méthode	45
4.6. Analyses statistiques	46
CHAPITRE 5. RESULTATS.....	47
5.1. Effet du rapport de charge N/P sur la taille des nanoparticules chitosan- ADN....	47
5.2. Effet du rapport de charge N/P sur le potentiel zêta des nanoparticules chitosan- ADN.....	48

5.3. Effet du rapport de charge N/P sur la taille des nanoparticules Fa-chitosan- ADN.	
.....	49
5.4. Effet du rapport de charge N/P sur le potentiel zêta des nanoparticules Fa-chitosan-ADN.....	50
5.5. Intégrité de l'ADN	51
5.6. La toxicité cellulaire.....	53
 CHAPITRE 6. DISCUSSION	54
 CHAPITRE 7. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	62
 RÉFÉRENCES.....	64

Liste des figures

Figure 1.1.	Mécanisme simplifié de la thérapie génique.....	5
Figure 3.1.	L'ADN ou l'information génétique.....	13
Figure 3.2.	Structure de l'acide folique.....	24
Figure 3.3.	Structure de la chitine et du chitosan.....	27
Figure 4.1.	Synthèse de l'acide folique conjugué au chitosan.....	40
Figure 5.1.	Effet du ratio de charge N/P sur la taille des nanoparticules chitosan-ADN.....	47
Figure 5.2.	Effet du ratio de charge N/P sur le potentiel zêta des nanoparticules chitosan-ADN.....	48
Figure 5.3.	Effet du ratio de charge N/P sur la taille des nanoparticules Fa-chitosan-ADN.....	49

Figure 5.4.	Effet du ratio de charge N/P sur le potentiel zêta des nanoparticules Fa-chitosan-ADN.....	50
Figure 5.5.	Analyse de la mobilité électrophorétique des nanoparticules chitosan-ADN and FA-chitosan-ADN pour déterminer l'intégrité du plasmide.....	52
Figure 5.6.	La viabilité des cellules HEK293 transfectées avec 10µg de FA-chitosan-ADN, chitosan-ADN, LipofectAMINE™2000-ADN, ADN seul et les cellules non traitées.....	53

Liste des sigles et abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
β -gal	enzyme lysosomal β -galactosidase <i>E-coli</i>
BMP-2	<i>Bone Morphogenic Protein-2</i> (protéine morphogénique de l'os 2)
CaP	calcium phosphate
CAT	acétyltransférase de chloramphénicol
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i> anhydre
DOPANT	dioleoylphosphatidyl-éthanolamines
DOTAP	le sulfate de N-1(-(2,3-dioleoyloxy)propyl)- N,N,N-triméthylammoniummethyl
DOTMA	chlorure de N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-triméthylammonium
EDC	hydrochloride 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
Fa	acide folique
Gal-LMWC	LMWCs galactolysé
GCP	polyéthylèneglycol
GPI	glycophosphatidylinositol membranaire
HCl	acide chloridrique
HEK293	cellules embryonnaires rénales humaines
Hela	lignée cellulaire carcinome humain

HepG2	lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain
HMWC	poids moléculaire élevé du chitosan
HSV	virus de l'herpès simplex
IgA	immunoglobuline A
IgG	immunoglobulin G
IGT	transfert intranasal de gène
KNOB	C-terminal du domaine globulaire de la protéine fibrillaire
LCA	ligament croisé antérieur
LIM	liposome dans une microsphère
LMWC	chitosan de faible poids moléculaire
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
ml	millilitre
mM	milli molaire
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
NaH ₂ PO ₄	monosodium phosphate
Na ₂ HPO ₄	disodium phosphate
NaOH	hydroxyde de sodium
Nm	nanomètre (10 ⁻⁹ mètre)
nM	nano molaire
N/P	rapport du nombre de charge positive des groupements amine du chitosan sur le nombre de charge négative des groupements phosphate de l'ADN

NPC	pores nucléaires des cellules
p53	protéine de 53 kDa
PC	polycations
pCMV-Luc	plasmide de cytomégalo virusluciférase
PEI	polyéthylèneimine
RSV	<i>Respiratory Syncytial Virus</i> (virus respiratoire syncytial)
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
TBE	Tris-Borate-EDTA
TGase1	transglutaminase 1
TMO	oligomères chitosan triméthylés
V	volts
° C	degrés centigrade
µg	microgramme
µl	microlitre
µm	micromètre
UV	ultraviolet

Chapitre 1 : Introduction

La thérapie génique est une approche thérapeutique qui consiste à insérer ou corriger des séquences géniques. L'insertion d'un gène ou d'un fragment d'acide désoxyribonucléique (ADN) doit pallier à une déficience dans le cas de maladies génétiques ou bien ajouter une nouvelle information pour traiter ses répercussions cliniques. La thérapie génique pourrait avoir soit un rôle curatif permettant de soigner certaines maladies ou un rôle préventif afin d'empêcher certaines pathologies. Cette nouvelle technologie pourrait être appliquée dans différents domaines de la santé tels que le cancer, le SIDA, et les maladies cardiovasculaires (Ozbas-Turan *et al.* 2003). Plusieurs maladies peuvent être traitées par le transfert du matériel génétique dans les cellules spécifiques d'un patient. Ce matériel génétique peut corriger les gènes défectueux responsables du développement de la maladie

C'est dans les années 80 que l'ensemble des gènes a commencé à être exploré et répertorié. Durant ces mêmes années, la mise au point de vecteurs pour transporter le transgène a été développée. La première stratégie de la thérapie génique consistait à prélever des cellules d'un patient pour modifier leur ADN avec des vecteurs ou par des méthodes physiques et ensuite à les réinjecter dans le patient. Mais les chercheurs ont remarqué que l'expression des gènes n'était pas toujours efficace (Blaese *et al.* 1995).

D'autres stratégies ont été mises au point en injectant directement un vecteur contenant le gène effecteur. Pour réaliser ceci, plusieurs vecteurs ont été développés pour assurer le transport efficace du gène au noyau. Ces vecteurs sont divisés en deux groupes, les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux. Les vecteurs viraux ont une grande efficacité de transfection, mais peuvent avoir des réactions oncogéniques et peuvent générer des réactions inflammatoires ou immunologiques. Par contre, les vecteurs non-viraux sont très sécuritaires mais leur niveau de transfection est faible (Ferber 2001).

Durant les quinze dernières années, il y a eu plus de 400 études cliniques qui ont été évaluées aux États-Unis seulement. (Breyer *et al.* 2001). En Europe, certaines études utilisant des protocoles de thérapie génique ont déjà été accomplies avec succès chez les patients présentant la fibrose kystique (Porteous *et al.* 1997) ou la déficience de l'adénosine déaminase (Bordignon *et al.* 1995). Cependant, dans certains cas, l'efficacité des protocoles réalisés n'était pas adéquate, principalement dû à l'inefficacité des vecteurs de transfert de gène qui ont été employés. La mort d'un adolescent (Jess Gelsinger âgé de 17 ans), dans une étude clinique de thérapie génique à l'Université de Pennsylvanie à Philadelphie a mis une fin abrupte aux études cliniques de la thérapie génique (Ferber 2001; Ferber 2001). La mort survenue est causée par une réaction immunitaire contre l'adénovirus que les médecins ont utilisé comme vecteur (Ferber 2001). Cet événement a poussé de

nombreux chercheurs vers l'utilisation de vecteurs non-viraux, vu le risque de l'utilisation d'un vecteur viral (Ferber 2001).

Les vecteurs non-viraux doivent être de nature cationique pour pouvoir interagir électrostatiquement avec l'ADN négativement chargé. La charge totale doit rester positive pour permettre une interaction efficace avec la membrane cellulaire et permettre ainsi l'internalisation du vecteur qui se fait généralement par les voies de l'endocytose (Behr 1994)

Les polymères cationiques au pH physiologiques qui se complexent avec l'ADN pour former des particules, les polyplexes, sont capables de transférer des gènes dans les cellules. De plus, leur poids moléculaire peut être modifié et aussi des ligands peuvent être conjugués facilement. Les lipides cationiques sont utilisés comme des vecteurs non viraux depuis 1987 sous forme de liposomes (Felgner *et al.* 1987). Récemment, les émulsions de lipides cationiques ont été étudiées comme des vecteurs non-viraux. Il y a aussi des peptides cationiques qui peuvent être utilisés comme des vecteurs non-viraux. Ils doivent être amphiphiles et contenir des acides aminés chargés positivement comme l'histidine, la lysine et l'arginine (El-Aneed 2004).

L'ADN à transférer dans les cellules doit échapper aux processus qui affectent sa disponibilité. Ces processus incluent l'interaction avec des composants sanguins, des cellules endothéliales vasculaires et le système réticulo-endothélial. En outre, la

dégradation de l'ADN thérapeutique par des nucléases est également un obstacle potentiel pour la livraison fonctionnelle à la cellule cible (Quong and Neufeld 1998). Par conséquent, le système idéal de livraison d'un gène doit être capable de protéger l'ADN jusqu'à ce qu'il atteigne sa cible. Le système doit être assez petit pour permettre l'internalisation dans les cellules et le passage au noyau, et il doit être capable d'échapper au système de l'endosome-lysosome (voir figure 1.1) (Mansouri *et al.* 2004). L'utilisation d'un système viral peut être dangereux pour le patient. Aussi l'utilisation d'un système non-viral à base de lipides cationiques n'est pas très efficace dû au fait que les lipides sont rapidement éliminés du corps. Ceci est causé par leur grande taille et le niveau de condensation de l'ADN qui est très faible (Gao and Huang 1996). Quant aux systèmes non-viraux peptidiques, ils ont un taux d'efficacité de transfection 10-40 fois plus faible que les vecteurs lipidiques et polymériques (Rittner *et al.* 2002). Les polymères cationiques ont un niveau de condensation de l'ADN plus optimal, ce qui permet d'obtenir de plus petites tailles et ainsi une meilleure efficacité de transfection. De plus, c'est un système de transfection non-viral plus sécuritaire. Pour pallier au fait que leur efficacité de transfection est faible, il est possible de conjuguer un ligand permettant d'augmenter l'efficacité de transfection du système.

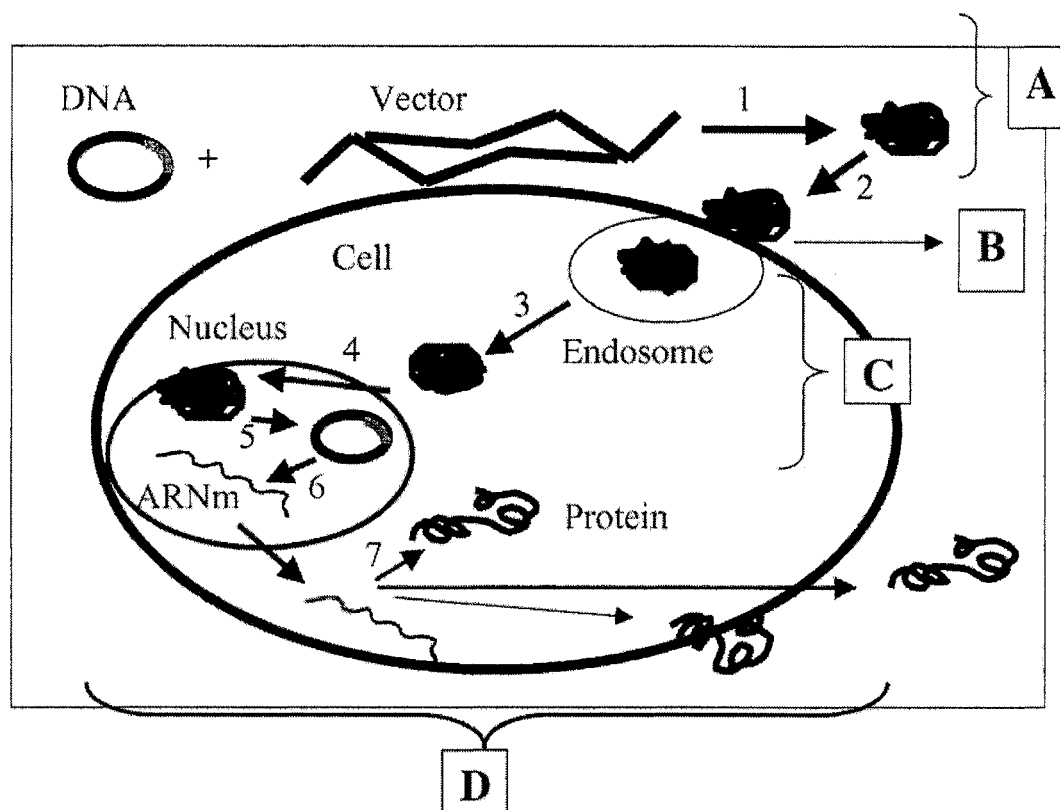


Figure 1.1. Mécanisme simplifié de la thérapie génique. (A) déplacement extracellulaire (1) insertion du gène dans le vecteur ; (B) contact avec la membrane cellulaire et internalisation ; (C) déplacement intracellulaire (2) prise du complexe vecteur ADN dans l'endosome ; (3) libération du complexe dans le cytoplasme ; (4) passage du complexe au noyau ; (D) expression du gène ; (5) dissociation de l'ADN du vecteur ; (6) transcription de l'ARNm ; (7) traduction de la protéine à partir de l'ARNm. La protéine peut être sécrétée hors de la cellule, soit exprimée dans le cytoplasme, ou fixée dans la membrane cellulaire (Mansouri *et al.* 2004).

Le vecteur non-viral qui semble être le plus efficace est le polymère cationique. Il présente beaucoup de potentiel pour sa modification permettant ainsi de l'améliorer pour augmenter le taux de transfection. Ce polymère doit être efficace pour condenser et réduire la taille des nanoparticules et avoir une meilleure internalisation de ces complexes. De plus, pour avoir un niveau élevé d'expression du gène, ce polymère devrait être biocompatible et biodégradable permettant une libération contrôlée de l'ADN exogène. Plusieurs études dans notre laboratoire et ailleurs ont démontré que le chitosan qui est un polymère naturel cationique est un bon candidat pour la thérapie génique. De plus, le chitosan peut être facilement modifié via ses groupements amines. Plusieurs études ont aussi démontré que le chitosan a un potentiel pour transfecter certains types cellulaires, mais le niveau de transfection est très faible. Pour augmenter le niveau de transfection, il est possible de modifier le chitosan en liant de façon covalente un ligand. Ce ligand doit avoir une grande affinité pour son récepteur. Aussi, il doit avoir le potentiel de se lier à son récepteur lorsqu'il est conjugué avec une molécule ou polymère. L'acide folique répond à toutes ces conditions puisque c'est un ligand dont le pouvoir de se lier à son récepteur ne diminuerait pas s'il est covalentement lié à un polymère (Antony 1996). De plus, il a une grande affinité pour son récepteur.

Les objectifs et les hypothèses seront présentés dans le chapitre 2. Une revue des états des connaissances sur la modification du chitosan pour la thérapie génique sera présentée dans le chapitre 3. Ce chapitre permettra aussi de mieux comprendre la

thérapie génique. Le matériel et la méthodologie détaillée de toutes les études seront présentés au chapitre 4. Dans le chapitre 5, les résultats obtenus seront exposés. La discussion de ces résultats sera présentée au chapitre 6. Le chapitre 7 va clore avec la conclusion ainsi que les perspectives suite à ce travail.

Chapitre 2. Objectifs et hypothèses

Dans ce chapitre, les objectifs et les hypothèses seront présentés.

2.1. Objectif général

L'objectif de ce projet était de réussir à conjuguer un ligand au chitosan pour le développement de nanoparticules pour la thérapie génique non-virale et d'optimiser les caractéristiques des nanoparticules permettant une meilleure internalisation cellulaire. Le ligand doit être capable de lier les groupements amines du chitosan sans toutefois modifier sa capacité à se complexer avec l'ADN. Ce ligand doit aussi avoir le potentiel de se lier à son récepteur même s'il est covalentement conjugué à un polymère tel que le chitosan. Dans ce projet, l'acide folique a été choisi pour répondre à ces critères. Ainsi le but de ce mémoire était de synthétiser et caractériser un système non viral de thérapie génique constitué d'acide folique, de chitosan et d'ADN.

2.2. Objectifs et hypothèses secondaires

Le premier objectif secondaire de ce projet est de conjuguer l'acide folique au chitosan. L'hypothèse de cette partie est que l'acide folique va se lier via ses

groupements carboxyles aux groupements amines du chitosan pour former un nouveau système de thérapie génique non-viral.

Le deuxième objectif secondaire est de synthétiser des nanoparticules avec le nouveau système de folate-chitosan et de l'ADN. Le but était de vérifier que l'acide folique conjugué au chitosan ne changerait pas les caractéristiques des nanoparticules.

Les études de caractérisations sont divisées en deux parties :

1. a) Études sur la taille et le potentiel zêta des complexes :

La taille et le potentiel zêta sont deux caractéristiques permettant une bonne internalisation des nanoparticules. Un potentiel zêta positif va permettre une bonne interaction des nanoparticules avec la membrane cellulaire. Une petite taille va favoriser l'endocytose de ces nanoparticules. La taille et le potentiel zêta des nanoparticules folate-chitosan-ADN ont été mesurés et comparés avec les nanoparticules chitosan-ADN.

1. b) Étude sur l'intégrité de l'ADN

L'ADN complexé au polymère doit être intact et fonctionnel une fois libéré de ce complexe pour avoir une expression génique de l'ADN à l'intérieur de la cellule. La prochaine étape était de vérifier que le plasmide reste intact après son extraction des complexes. L'hypothèse de cette étape est que le folate conjugué au chitosan n'affecte pas l'intégrité de l'ADN.

Le troisième objectif secondaire de ce projet était d'étudier la biocompatibilité des complexes Fa-chitosan-ADN *in vitro*. Puisque le chitosan est reconnu suite à plusieurs études pour sa biocompatibilité, l'hypothèse dans cette étape est que l'acide folique conjugué au chitosan ne causerait pas de toxicité cellulaire. La cytotoxicité a été évaluée 48 heures après incubation des nanoparticules avec les cellules embryonnaires rénales humaines (HEK293).

Chapitre 3. État des connaissances

Une revue de l'état des connaissances comprenant la thérapie génique ainsi qu'une description des thérapies virales ou non virales sera présentée dans ce chapitre. De plus, il y aura une revue des types de modifications que le chitosan a subi afin d'améliorer son efficacité de transfection cellulaire.

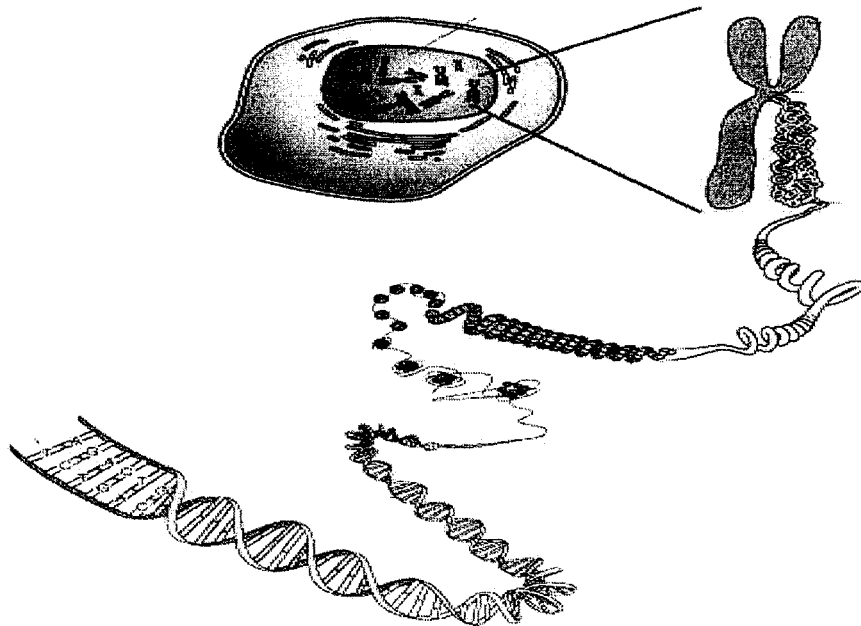
3.1. Thérapie génique

L'information génétique est contenue dans chaque cellule sous forme d'acide désoxyribonucléique (ADN). Un gène est une séquence d'ADN, il est donc présent dans les chromosomes de toutes les cellules (figure 3.1). Une séquence d'ADN est formée de plusieurs nucléotides formés d'un sucre à 5 atomes de carbone, le désoxyribose, d'un groupement phosphate et d'une base azotée parmi les quatre possibles : adénine, guanine, thymine et cytosine. Ces bases azotées sont complémentaires deux à deux et reliées par des liaisons hydrogènes faibles. Elle se relie ainsi: adénine-thymine et cytosine-guanine.

Les gènes sont des facteurs héréditaires qui sont responsables des caractères phénotypiques de l'individu (à un caractère peut être associés plusieurs gènes). En effet les gènes gouvernent la synthèse d'acide ribonucléique (ARN), séquence qui peut être traduite en chaîne polypeptidique (protéine), qui sont directement ou

indirectement responsables de tous les caractères de l'organisme. Un défaut au niveau de l'expression des gènes ou des protéines peut causer une maladie; par exemple, un défaut dans le gène exprimant la p53 (protéine de 53 kDa) peut causer le cancer (Horowitz 1999). Plusieurs maladies sont reliées à des défauts génétiques comme la dystrophie musculaire, l'hémophilie, myopathie de Duchenne et plusieurs types de cancer.

La thérapie génique a connu une progression fulgurante depuis les dix dernières années. Bien qu'elle se présente comme une méthode révolutionnaire et très prometteuse, il n'en reste pas moins que les recherches à son sujet sont loin d'être achevées. Si les applications de la thérapie génique paraissent immenses, la tâche qui reste à accomplir l'est également. Dès 1978, date de l'isolement des premiers gènes humains, l'identification de plusieurs d'entre eux a permis de mieux les connaître et les comprendre. De plus, le mauvais fonctionnement de certains gènes est associé à une maladie en particulier. Ces dernières sont généralement causées par le fait que le gène en question déclenche une production insuffisante de protéines, substances nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. C'est à ce moment que la thérapie génique intervient en corrigeant les défauts des gènes. Cela consiste principalement à injecter un gène sain dans la cellule pour remplacer le gène défectueux. On utilise alors un vecteur, une sorte de moyen de transport, qui conduira le gène sain à la cellule visée.



http://www.inapg.inra.fr/ens_rech/bio/biotech/images/seqgenome/presentation-adn.jpg

Figure 3.1. L'ADN ou l'information génétique se trouve dans le noyau de toutes les cellules humaines, aggloméré sous forme de chromosomes.

3.1.1 Application de la thérapie génique

Les applications de la thérapie génique au sens large sont extrêmement nombreuses. Puisque les gènes sont à l'origine des protéines et que les anomalies des protéines sont à l'origine de diverses maladies, le champ d'application paraît illimité. Il serait normal d'utiliser la thérapie génique en premier lieu pour compenser un gène défectueux ou manquant en cas de maladies dites génétiques, dans la mesure où le ou

les gènes responsables ont été identifiés. C'est en 1990 que la première thérapie génique *ex-vivo* a été utilisée dans le cas de la déficience du gène de l'adénosine déaminase (Blaese *et al.* 1995). Des cellules ont été prélevées sur des patients et incubées avec des vecteurs contenant le gène de l'adénosine déaminase et ensuite réinjectées chez les patients. Les résultats ont montré une hausse des niveaux de l'enzyme et ceci a permis de diminuer la déficience chez les patients.

En deuxième lieu, la thérapie génique pourrait être utilisée pour apporter un gène capable d'être à l'origine d'une protéine utile à un malade (cytokine, hormones, enzymes, antigènes, vaccins ou anticorps...). Dans le cas d'un cancer, il est possible d'utiliser le gène codant pour la p53 responsable de la mort cellulaire programmée ou apoptose. De cette façon, les cellules cancéreuses vont être supprimées. Il est aussi possible d'utiliser des gènes anti-angiogéniques capable de limiter l'expansion de la tumeur. La thérapie génique peut être un moyen préventif pour plusieurs maladies par le développement des gènes qui induisent une réponse immunitaire nécessaire pour qu'un vaccin soit efficace (Cui and Mumper 2001).

En troisième lieu, il est possible aussi d'utiliser cette thérapie pour empêcher la production d'une protéine jugée néfaste, un facteur de croissance par exemple, par l'utilisation des oligonucléotides antisens. Un des premiers médicaments antisens à être utilisé en thérapeutique a été le fomivirsen (Grillone and Lanz 2001). Il s'agit d'une séquence oligonucléotidique complémentaire d'une séquence de ARN messenger du cytomégalo virus de la rétinite. Administré par voie intravitréenne (dans le corps

vitré), il inhibe la réplication du cytomégalovirus en arrêtant la synthèse d'un certain nombre de protéines (Detrick *et al.* 2001; Grillone and Lanz 2001). Il est utilisé en traitement local de la rétinite à cytomégalovirus chez des patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise SIDA (Detrick *et al.* 2001).

Finalement, la thérapie génique peut être utilisée pour la régénération cellulaire. Dans le domaine du génie tissulaire, la régénération du cartilage, des tendons et des ligaments, serait une possibilité. Si le ligament croisé antérieur (LCA) du genou d'un patient est déchiré, il serait possible d'injecter dans cette lésion des facteurs de croissance qui vont accélérer considérablement le temps de cicatrisation. Les facteurs de croissances ayant une demi vie très courte, il faut les injecter fréquemment pour avoir une bonne et rapide cicatrisation. D'après l'équipe de Abe et al. la thérapie génique locale, qui implique la livraison des facteurs de croissance à un emplacement anatomique spécifique, a le potentiel d'augmenter la formation osseuse (Abe *et al.* 2002). Cette même équipe a démontré que lorsque les cellules de moelle de rat infectées par le vecteur de l'adénovirus-associé produisant le facteur de croissance BMP-2 (*Bone Morphogenic Protein-2*) ont été implantées dans des souris, de la néoformation osseuse a été démontrée après 2 semaines. Ce type de vecteur s'avère fortement utile pour la néoformation osseuse chez les patients présentant une perte osseuse liée au trauma, à l'arthroplastie totale, ou au cancer (Abe *et al.* 2002).

3.2. Vecteurs en thérapie génique

Les vecteurs en thérapie génique ont pour rôle de transporter efficacement les gènes dans les cellules. Les types de vecteurs sont généralement divisés en vecteurs viraux ou non-viraux. Dans la première partie, l'injection directe de l'ADN sera présentée pour connaître l'utilité d'un vecteur. Ensuite, les avantages et désavantages des vecteurs viraux et non-viraux seront présentés.

3.2.1. L'injection directe de l'ADN seul

Le système de livraison de gène non-viral le plus simple emploie simplement l'ADN nue. L'injection directe de l'ADN libre dans certains tissus, en particulier dans le muscle, a été démontrée pour produire des niveaux élevés de l'expression du gène, et la simplicité de cette approche a mené son adoption dans un certain nombre de protocoles expérimentaux (Wolff *et al.* 1990). L'injection directe de l'ADN nue dans la peau intacte a été prometteuse et est plus simple que des approches comportant la greffe de cellules génétiquement modifiées (Choate and Khavari 1997). De plus, l'injection cutanée directe de l'ADN a été réalisée chez les patients souffrant d'ichthyose lamellaire, un état génétique provoqué par une perte de l'expression de la transglutaminase 1 (TGase1). Cette étude a montré que la peau recevant les injections *in vivo* répétées avec un plasmide exprimant la TGase1 a permis la restauration de l'expression TGase1 dans l'endroit correct de tissu dans l'épiderme supra basal (Choate and Khavari 1997). Cependant, d'autres analyses ont indiqué que l'expression était non-uniforme et ne corrigeait pas les anomalies fondamentales

histologiques et fonctionnelles de la maladie (Choate and Khavari 1997). Bien que l'injection directe de l'ADN a induit une expression du gène, le niveau global de l'expression est beaucoup plus faible qu'avec les vecteurs viraux ou non-viraux. L'ADN nu est également peu convenable pour l'administration systémique due à la présence des nucléases dans le sérum qui vont la dégrader. En conséquence, l'injection directe de l'ADN semble être limitée aux tissus qui sont facilement accessibles à l'injection directe tels que la peau et le muscle.

3.2.2. Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux les plus communs utilisés aujourd'hui sont les rétrovirus, les adénovirus, le virus de l'herpès simplex (HSV), l'adénovirus associé et le poxvirus (vaccina virus). Chacun a ses propres caractéristiques (Oligino *et al.* 2000). L'avantage d'employer des vecteurs viraux est leur capacité de s'insérer dans les cellules et d'exprimer leurs propres protéines. Ce type de vecteur permet un taux élevé de transfection et une transcription rapide du matériel étranger inséré dans le génome viral. Cependant, l'utilisation de virus dans la thérapie génique est limitée par divers facteurs. En premier lieu, la sécurité relié au type de vecteur utilisé est devenue très importante suite à la mort d'un patient pendant une étude clinique de la thérapie génique en utilisant des vecteurs viraux (Ferber 2001; Somia and Verma 2000).

Deuxièmement, la thérapie génique employant des vecteurs viraux est limitée par le fait que seulement des petits fragments d'ADN peuvent être insérés dans le génome de virus. Troisièmement, les virus présentent une variété de problèmes potentiels aux patients tels que la toxicité, les réactions immunitaires, et les réponses inflammatoires. Pour finir, la mutagenèse insertionnelle et les effets oncogènes peuvent se produire une fois utilisés *in vivo* (Lee *et al.* 1998). Les limitations des vecteurs viraux, en particulier concernant des soucis de sécurité, ont mené à l'évaluation et au développement des vecteurs alternatifs basés sur les systèmes non-viraux.

3.2.3. Les vecteurs non-viraux

Les phospholipides cationiques et les polymères cationiques non-viraux sont les deux types de vecteurs non-viraux principaux de la livraison du gène actuellement étudiés. En raison de leur charge cationique permanente, les deux types agissent électrostatiquement avec l'ADN négativement chargée et forment des complexes (lipo- ou polyplexes). Les liposomes formés de phospholipides cationiques offrent plusieurs avantages (par exemple, une faible immunogénicité et une facilité de préparation) (Deshpande *et al.* 1998). Toutefois, la toxicité des lipides cationiques et la faible efficacité de transfection comparées aux vecteurs viraux (Oligino *et al.* 2000) sont les inconvénients principaux. Les complexes d'ADN/polymère impliquant les polymères cationiques, d'autre part, sont plus stables que les lipides cationiques (De Smedt *et al.* 2000). Cependant, comparé aux vecteurs viraux, l'efficacité de la

livraison du gène par les polymères cationiques reste relativement faible (Garnett 1999). Des polymères cationiques ont été employés pour condenser et livrer l'ADN *in vitro* et *in vivo*. Plusieurs polymères cationiques ont été étudiés et ont montré une amélioration au niveau de l'efficacité de transfection (Ferber 2001; Somia and Verma 2000). Les polymères cationiques sont variables et ont une polyvalence structurale permettant de les modifier à l'aide de liaisons covalentes de ligands spécifiques visant ainsi l'expression du gène médié par les récepteurs spécifiques (Somia and Verma 2000).

3.2.3.1. Les lipides cationiques

Les lipides cationiques ont été employés pour la livraison de médicaments encapsulés, et peuvent être employés en tant que vecteurs pour la thérapie génique (Shi *et al.* 2002; Zelphati *et al.* 2001). Ils peuvent agir spontanément avec l'ADN négativement chargée pour former des vésicules agrégées le long de l'acide nucléique (Wheeler *et al.* 1999). À la concentration micellaire critique, l'ADN est condensé et devient encapsulé dans une bicouche de lipide. Cependant, il est possible que les liposomes cationiques n'encapsulent pas réellement l'ADN, mais se lient le long de la surface de l'ADN, maintenant sa forme originale. Les liposomes cationiques peuvent également agir avec les membranes négativement chargées des cellules où la fusion entre les vésicules cationiques et la surface des cellules permet la livraison de l'ADN directement à travers la membrane plasmique (Zelphati *et al.* 2001). Néanmoins, il

est connu que les complexes de liposomes-ADN sont cytotoxiques *in vitro* (Brown *et al.* 2001).

Des liposomes cationiques peuvent être formés d'une variété de lipides cationiques, bien qu'elles incorporent habituellement un lipide neutre, tel que des dioleoylphosphatidyl-éthanolamines (DOPANT), à la formulation afin de faciliter la fusion membranaire (Liu and Huang 2002). Une variété de lipides cationiques a été développée pour agir avec l'ADN, mais les mieux connus sont le sulfate de N-1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammoniummethyl (DOTAP) et le chlorure de N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium (DOTMA).

Plusieurs études sont en cours pour étudier l'utilisation systémique des complexes de liposome/ADN *in vivo* (Gill *et al.* 1997; Laitinen *et al.* 2000). Les complexes formés entre le lipide et l'ADN cationiques sont rapidement éliminés de la circulation sanguine et se sont avérés pour être largement distribués dans le corps (Liu and Huang 2002; Song and Liu 1998). L'efficacité de transfection des complexes de liposome/ADN est relativement faible *in vivo*, particulièrement lorsque ceci est comparée aux vecteurs viraux (Audouy *et al.* 2002). L'efficacité de transfection relativement faible des complexes de liposome/ADN peut être expliquée par la susceptibilités des complexes d'être dégradés par les protéines contenu dans le sérum (Liu and Huang 2002; Song and Liu 1998). Diverses protéines sont connues pour se lier aux liposomes *in vitro* et *in vivo*, qui peuvent mener à la déstabilisation de la

membrane. Le ciblage des cellules spécifiques par des liposomes a été également étudié pour améliorer l'efficacité de transfection par plusieurs chercheurs.

3.2.3.2. Des polymères cationiques

Généralement, les polymères cationiques sont utilisés en raison de leurs capacités à condenser l'ADN efficacement et leur interaction avec la cellule (Gao and Huang 1996). Les complexes d'ADN/polymère impliquant les polymères cationiques sont plus stables que ceux qui impliquent les lipides cationiques. Le mécanisme de transfert du gène à travers la membrane cellulaire n'est pas bien compris, et jusqu'ici, les polymères cationiques explorés en tant que vecteurs non-viraux sont relativement faibles pour transporter des molécules d'ADN à travers la membrane. Les polymères cationiques peuvent mieux condenser l'ADN que les lipides. Ils forment des complexes avec l'ADN et le protègent contre la dégradation des nucléases (Gao and Huang 1996). Pour atteindre les cellules, les complexes doivent aisément se répandre par le réseau capillaire, échapper aux macrophages et interagir avec la membrane cellulaire (Kuo and Saltzman 1996). Ces complexes sont internalisés, probablement par endocytose, puis sortent de l'endosome dans le cytoplasme et atteignent le noyau où ils peuvent être transcrits (Zabner *et al.* 1995).

Les polymères cationiques incluent la gélatine (Leong *et al.* 1998; Truong-Le *et al.* 1999), le polyéthylèneimine (PEI) (Boussif *et al.* 1995), la poly(L-lysine) (Bielinska *et*

al. 2000; Oupicky *et al.* 2000), le polybrene (Mumper *et al.* 1996), le tétraminofullerène (Isobe *et al.* 2001), la poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) (Benns *et al.* 2000) et le chitosan (Corsi *et al.* 2003). Bien que les systèmes de polymères cationiques ont quelques avantages par rapport aux vecteurs viraux, comme la faible immunogénicité et la facilité de fabrication (Deshpande *et al.* 1998), plusieurs problèmes tels que la toxicité, le manque de biodégradabilité, la faible efficacité de transfection et la biocompatibilité doivent être résolus avant leur utilisation pratique *in vivo* (Pouton and Seymour 2001).

3.3 L'acide folique

L'obstacle principal pour l'application clinique de la thérapie génique est le manque de vecteurs de transfert de gène qui soient sûrs, efficaces et sélectifs. Ces dernières années, la livraison ciblée de gènes par les récepteurs cellulaires, en utilisant des vecteurs viraux ou non-viraux, émerge comme une nouvelle approche pour augmenter l'efficacité de livraison sélective de gènes. De plus, le ciblage de certains types de tissu avec des ligands comme l'acide folique peut réduire les effets secondaires et apporter un effet bénéfique au tissu atteint.

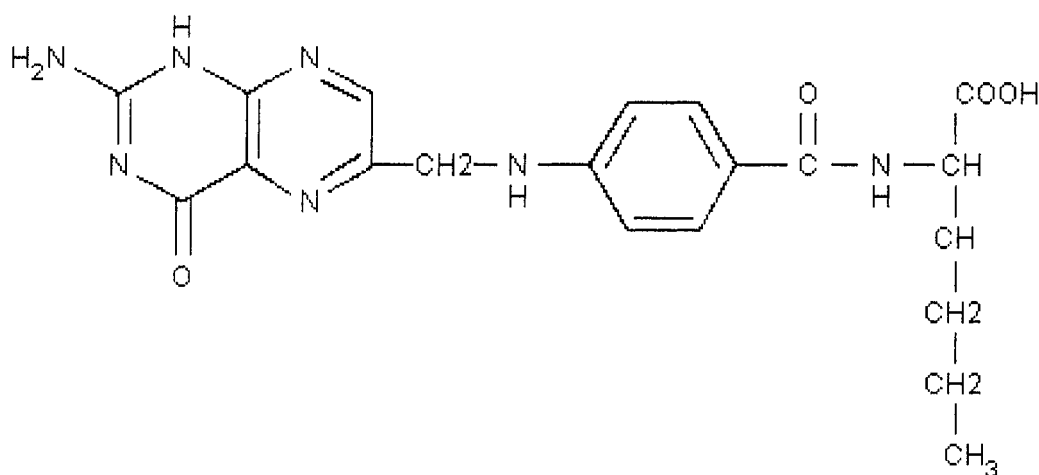
La vitamine B9, comme toutes les vitamines du groupe B, est hydrosoluble. L'acide folique (folate) est la vitamine B9 qui contribue à la croissance harmonieuse du fœtus. C'est une vitamine essentielle au développement normal de la colonne vertébrale, du cerveau et du crâne du bébé (Czeizel 2000; Lucock *et al.* 2000).

La vitamine B9 joue un rôle essentiel dans la production du matériel génétique (ADN, ARN) et des acides aminés nécessaires à la croissance cellulaire (Lucock and Daskalakis 2000). Elle est également impliquée dans la synthèse de neuromédiateurs qui jouent un rôle fondamental dans le métabolisme du cerveau et des nerfs. Elle a notamment un rôle important dans la formation des globules rouges, le fonctionnement du système nerveux et du système immunitaire, ainsi que dans la cicatrisation des blessures et des plaies (Lucock 2000). Elle est nécessaire à la production de nouvelles cellules, ce qui la rend particulièrement importante durant les périodes de croissance rapide comme l'enfance, l'adolescence et la grossesse (développement du fœtus) (Czeizel 2000; Lucock *et al.* 2000).

Ainsi, une carence en acide folique provoque un ralentissement de la multiplication des cellules, notamment des cellules à fort taux de renouvellement comme les cellules sanguines (globules rouges et blancs), celles de l'intestin, du foie et de la peau. Les signes de cette hypovitaminose sont donc l'anémie, les troubles digestifs et neurologiques et les atteintes des muqueuses (Lucock 2000).

L'acide folique (fa) a été choisi par notre groupe comme un ligand pour cibler la membrane cellulaire et permettre ainsi l'endocytose des nanoparticules par l'intermédiaire du récepteur folique pour un taux de transfection plus efficace. D'une manière primordiale, l'affinité élevée du folate pour lier son récepteur (1nM) (Antony 1996) et la petite taille de l'acide folique permettent son utilisation pour cibler les

cellules. D'ailleurs, la capacité de l'acide folique de lier son récepteur qui permet l'endocytose n'est pas modifiée par la conjugaison covalente de petites molécules (Leamon and Low 1991; Lee and Low 1994; Wang *et al.* 1997).



http://fr.wikipedia.org/wiki/Vitamine_B9

Figure 3.2. Structure de l'acide folique

Le récepteur folique est une glycoprotéine liée à la glycoposphatidylinositol membranaire (GPI) avec un poids moléculaire apparent de 38-40 kDa. Il y a deux isoformes du récepteur qui ont été identifiés chez l'homme, désigné α et β . Le récepteur de l'acide folique est surexprimé à la surface de cellules cancéreuses humaines (Antony 1996). L'isoforme nonépithéliale du récepteur folate β est

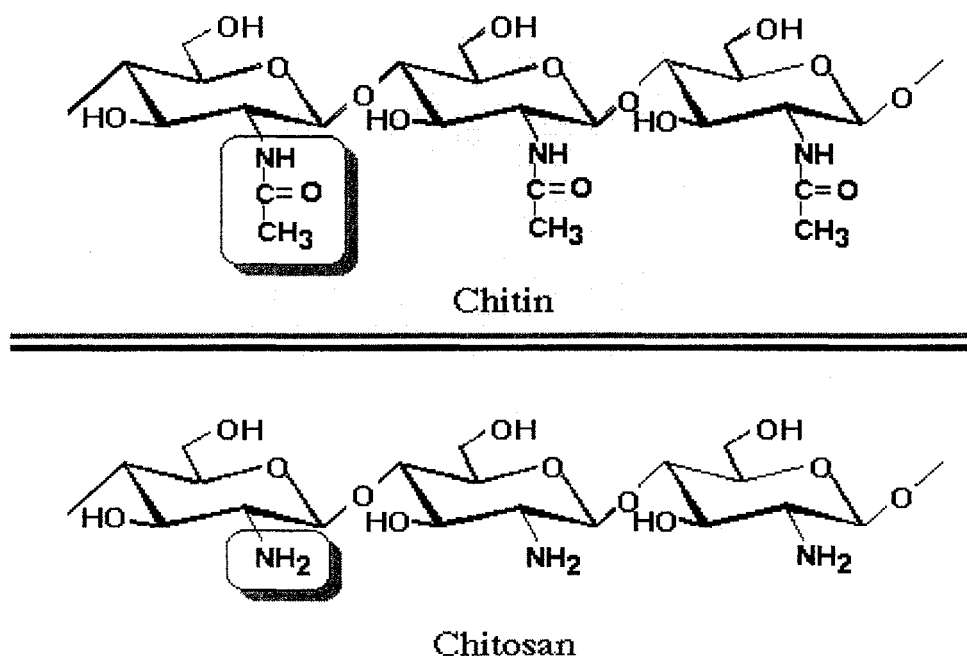
exprimé sur les macrophages synoviaux activés présents en grandes quantités chez les patients ayant l'arthrite rhumatoïde (Paulos *et al.* 2004; Turk *et al.* 2002).

3.4. Chitosan

Le chitosan est un polymère polycationique biodégradable non-toxique avec une faible immunogénicité. C'est un bon candidat pour le système de livraison de gène parce que le chitosan est positivement chargé et peut être complexé avec l'ADN négativement chargé (MacLaughlin *et al.* 1998; Richardson *et al.* 1999). Le chitosan a la capacité de se lier efficacement à l'ADN et de le protéger contre la dégradation des nucléases (Cui and Mumper 2001; Illum *et al.* 2001). Il présente l'avantage de ne pas nécessiter la sonication et les solvants organiques pour sa préparation, donc réduisant ainsi au minimum les dommages possibles à l'ADN pendant la complexation. Des nanoparticules chitosan-ADN chargées sont stables pendant le stockage (Leong *et al.* 1998). L'application des nanosphères chitosan-ADN a avancé la recherche *in vitro* concernant la transfection d'ADN et les données montrent leur utilité pour la livraison de gène (Corsi *et al.* 2003; Erbacher *et al.* 1998).

Le chitosan (α (1 $\rightarrow$ 4) 2-amino-2-deoxy-b-D-glucan) est obtenu par le processus de déacétylation alcaline de la chitine (voir figure 3.3). La chitine est un polysaccharide trouvé dans l'exosquelette des crustacés et des insectes (Romoren *et al.* 2002). La

molécule chitosan est un copolymère de N-acétyle-D-glucosamine et de D-glucosamine. Ce polymère est une base faible avec une valeur de pKa du résidu D-glucosamine environ de 6.2-7.0 et est donc insoluble à pH neutre et alcalin. Dans des milieux acides, les groupements amines seront positivement chargés, conférant au polysaccharide une densité de charge élevée (Hejazi and Amiji 2003). Sa nature de polyelectrolyte cationique présente une forte interaction électrostatique avec le mucus, les surfaces muqueuses négativement chargées et d'autres macromolécules telles que l'ADN (Fang *et al.* 2001; Hejazi and Amiji 2003). Le chitosan a été employé comme véhicule pour la livraison nasale, oculaire et orale de médicament afin de prolonger le temps de contact et améliorer l'absorption du médicament. Il a été également employé pour la thérapie génique (Romoren *et al.* 2002). Ses caractéristiques intrinsèques démontrent que c'est un polymère qui peut être utilisé pour une variété d'applications biomédicales et pharmaceutiques.



<http://dalwoo.com/chitosan/structure.gif>

Figure 3.3. Structure de la chitine et du chitosan

3.5. Des stratégies pour améliorer l'efficacité de transfection génique

3.5.1. Chitosans modifiés pour la thérapie génique

3.5.1.1 Chitosan lactosylé

Erbacher et al. (1998) ont étudié les vecteurs de chitosan lactosylé et de chitosan pour leurs efficacités de transfection *in vitro* (Erbacher *et al.* 1998). Dans cette étude, l'efficacité de transfection du chitosan avec les cellules Hela en présence de 10% de sérum de veau fœtal a été trouvée comparable à celle d'un autre polymère cationique,

le polyéthylèneimine (PEI). Il a été démontré que ces vecteurs étaient faiblement efficaces dans la transfection de la membrane de lectine spécifique au galactose des cellules HepG2 (lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain). Ceci a été probablement provoqué par l'agrégation des complexes du à la diminution du potentiel zêta après lactosylation, accompagnée d'une faible affinité avec l'ADN du polymère lactosylé. De plus, une autre équipe a tenté de complexer la chloroquine au chitosan, une base faible empêchant l'acidification lysosomal, mais sa présence n'a pas amélioré l'efficacité de transfection (Pouton and Seymour 2001).

3.5.1.2. Le chitosan galactosylé greffé avec le polyéthylène glycol (GCP)

Park et al. ont employé le chitosan galactosylé greffé avec le polyéthylèneglycol (GCP) comme vecteur d'ADN (Park *et al.* 2001). La dimension particulière des complexes de GCP/ADN est petite, avec une valeur minimale d'environ 27 nm. L'ADN complexée avec le GCP est stable et protégée contre la dégradation enzymatique de la DNase. Cependant, l'efficacité de transfection employant des complexes de GCP/ADN est très faible, principalement en raison de l'interaction avec le plasma menant à la dissociation des complexes de GCP/ADN.

3.5.1.3. Quaternisation de l'oligomère de chitosan

Une autre approche pour augmenter le taux de transfection en utilisant le chitosan comme vecteur, consiste à préparer les oligomères chitosan triméthylés (TMO) par

quaternisation comme démontré par Thanou et al. (Thanou *et al.* 2002). Ce processus est basé sur un procédé réducteur de méthylation en utilisant l'iodure méthylique dans un milieu alcalin (Thanou *et al.* 2002). Ces polycations (PC) ont été caractérisés et examinés pour leur efficacité de transfection des cellules COS-1 (rein) et les cellules Caco-2 (épithéliales). Lorsque le chitosan et les oligomères chitosan quaternisés sont mélangés à l'ADN, ils forment spontanément des complexes. Tous les dérivés synthétisés ont montré une excellente hydrosolubilité à différentes valeurs du pH. Aux rapports de 2:100 et de 2:10 ADN/oligomère. Le TMOs a formé de plus petits complexes comparés aux oligomères chitosan non modifiés (Thanou *et al.* 2002). Les complexes ont été testés pour un ciblage spécifique aux cellules Hep-G2 et pour l'expression du gène rapporteur de la β -gal. Les résultats démontrent que les complexes transfectent efficacement les cellules Hep-G2, probablement par internalisation par l'intermédiaire du récepteur de galactose sur la surface cellulaire des cellules HepG-2.

3.5.1.4. Les complexes de chitosan/ADN/ligand

Une autre approche pour augmenter le taux de transfection consiste à utiliser des ligands pour cibler les complexes de polymère/ADN aux récepteurs spécifiques à la surface de cellules. Le récepteur de la transferrine était un des premiers à être exploité pour la livraison de gène médiée par un récepteur. Le nombre de molécules de transferrine attachées à la surface de chaque nanoparticule change selon le poids moléculaire du polymère (Sato *et al.* 2001). Ce système est basé sur l'endocytose

médiée par le récepteur de la transferrine pour transporter l'ADN exogène dans des cellules et permettre un taux de transfection plus élevé. Comparée au chitosan non-modifié, la méthode a comme résultat une augmentation de l'efficacité de transfection qui quadruple selon la lignée cellulaire. Un modèle semblable, la conjugaison de la protéine KNOB (C-terminal du domaine globulaire de la protéine fibrillaire) aux nanoparticules chitosan-ADN a eu comme résultat une augmentation de 130 fois de l'efficacité de transfection avec les cellules Hela et une augmentation de plusieurs fois dans les cellules HEK293. La présence du sérum de veau fœtal de 10% n'a pas interféré au niveau du rendement de transfection, montrant le manque d'interaction lorsque l'administration systémique sera employée (Sato *et al.* 2001). L'efficacité de transfection dépend du type cellulaire et du niveau d'expression du récepteur de la transferrine à la surface cellulaire. L'efficacité de transfection a augmentée quand un agent endosomalytique tel que la chloroquine a été employé. Généralement, des agents endosomalytiques sont employés pour favoriser la libération endosomale et permettre la livraison cytoplasmique des complexes internalisés par endocytose médié par un récepteur (Ishii *et al.* 2001). Le traitement avec ces agents a eu comme résultat une augmentation de quatre fois du nombre de récepteurs et une augmentation quintuple de l'expression du gène rapporteur.

3.5.1.5. Vecteur de chitosan modifié avec l'acide déoxycholique

Lie et Kim ont proposé de modifier le chitosan ($MV = 7.0 \times 10^4$, degré de déacétylation 80%) hydrophobiquement par l'acide déoxycholique (Kim *et al.* 2001; Lee *et al.* 1998). L'acide déoxycholique est un composant principal de l'acide biliaire. Puisque l'acide biliaire peut s'assembler dans l'eau, le chitosan modifié avec l'acide déoxycholique peut s'auto-associer également pour former des micelles d'un diamètre moyen de 160 nm. La transfection des cellules COS-1 (cellules rénales de singe) avec les agrégats de complexes chitosan/ADN a été examinée en utilisant le plasmide codant pour l'acétyltransférase de chloramphénicol (CAT). L'efficacité de transfection des complexes est augmentée par rapport à celle réalisée par l'ADN seul mais inférieure à celle réalisée par la lipofectamine. Ce système reste avec une efficacité de transfection moindre comparé aux formulations standard de chitosan/ADN

3.5.1.6. Le liposome dans une microsphère de chitosan

Récemment, un nouveau système de livraison de médicament et de la thérapie génique a été proposé par le groupe de Feng (Feng *et al.* 2004). Ce système est à base de liposome dans une microsphère (LIM) de polymères biodégradables. Il est conçu d'une combinaison de polymères et de systèmes de lipide et peut intégrer ainsi les avantages et éviter les inconvénients des deux systèmes. Des liposomes ont été encapsulées dans des microsphères de polymères biodégradables par le processus

d'extraction/évaporation du solvant pour former les LIMs. L'intégrité des liposomes a été préservée en modifiant le processus de microencapsulation et en enduisant les liposomes de chitosan. La morphologie de surface des microsphères polymériques n'a pas changé de manière significative avec des liposomes encapsulés. Les liposomes encapsulés sont restés intacts dans la matrice polymérique des microsphères, et pourraient être libérés des microsphères d'une façon contrôlée à un taux de libération presque constant après une période de libération initial. La diminution de la dimension particulière des liposomes et l'augmentation de la taille de pore de la matrice polymérique ont diminué la période initiale de libération et ont augmenté le taux de libération de liposome (Feng *et al.* 2004).

3.6. Applications cliniques potentielles

3.6.1. L'immunisation génétique mucoale.

Pour examiner l'immunisation génétique muqueuse potentielle, Kumar et al. ont utilisé une stratégie impliquant un transfert intranasal de gène, désigné sous le nom d'IGT, complexé avec des nanosphères de chitosan/ADN contenant un cocktail d'ADN codant neuf antigènes immunogènes du virus RSV (*respiratory syncytial virus*) (Kumar *et al.* 2002). Ce système a été étudié contre l'infection aiguë du RSV dans un modèle de souris de BALB/c. L'efficacité et le mécanisme de cette stratégie d'IGT ont été étudiés, et les résultats ont démontré que l'IGT est sûr et efficace contre

le RSV puisqu'il atténue de manière significative l'inflammation pulmonaire induite par l'infection de RSV (Kumar *et al.* 2002). Ce système est une nouvelle approche de transfert de gène contre l'infection de RSV, qui à une dose simple d'environ 1 mg/kg de poids corporel, est capable de diminuer des titres viraux par deux ordres de grandeur (de 100 fois) sur l'infection primaire. Les mécanismes immunologiques pour l'efficacité de cette prophylaxie incluent l'induction des niveaux élevés des anticorps IgG (immunoglobuline G) du sérum et d'IgA (immunoglobuline A) muqueuses, la génération d'une réponse contrôlée efficace et une production élevée d'interféron- γ spécifique au poumon avec l'action antivirale. En outre, l'IGT diminue de manière significative l'inflammation pulmonaire et ne change pas l'hypersensibilité des voies aériennes, de ce fait le rendant sûr pour l'usage *in vivo* (Kumar *et al.* 2002).

3.6.2. La livraison pulmonaire de gène

Afin d'étudier le potentiel du chitosan sous forme de poudre inhalée comme système de livraison de gène, Okamoto *et al.* ont préparé une poudre en utilisant le plasmide de cytomégalo virus luciférase (pCMV-Luc) comme gène rapporteur et le chitosan à faible poids moléculaire (3000-30.000 Da) comme vecteur cationique (Okamoto *et al.* 2003). Les poudres chitosan/ADN obtenues ont été administrées aux poumons de souris. L'efficacité de transfection de ces poudres a été comparée à celle des solutions d'ADN et des poudres d'ADN sans vecteur cationique. La poudre avec un polymère

cationique s'est avérée un excellent système de livraison de gène aux poumons, comme établi par un taux élevé de transfection et une expression élevée de la protéine luciférase. Les avantages des poudres chitosan-ADN examinées ont été récapitulés comme suit : (a) l'addition de chitosan a supprimé la dégradation du plasmide de cytomégalo virus luciférase (pCMV-Luc); (b) l'addition de chitosan a augmenté le rendement de poudres ; (c) les poudres chitosan-ADN a augmenté l'activité de luciférase dans le poumon de souris comparé aux poudres de pCMV-Luc sans chitosan ou de solutions pCMV-Luc avec ou sans chitosan (Okamoto *et al.* 2003).

3.6.3. L'utilisation de l'acide folique pour cibler les cellules cancéreuses

Le récepteur de l'acide folique constitue une cible utile pour la livraison de médicament aux tumeurs cancéreuses spécifiques, principalement parce que : (1) il est surexprimé dans la plupart des cancers humains, y compris le cancer des ovaires, du cerveau, du rein, du sein, des cellules myéloïdes et du poumon, (2) l'accès au récepteur folique dans les tissus normaux qui l'expriment peut être limité dû à son emplacement sur la membrane apicale de l'épithélium polarisé, et (3) la densité du récepteur de l'acide folique semble augmenter si le cancer est à un stade avancé (Lu and Low 2002). Ainsi, les cancers les plus difficiles à traiter par les méthodes classiques peuvent être facilement ciblés avec des médicaments thérapeutiques conjugués avec l'acide folique.

Pour exploiter ces particularités d'expression du récepteur folate, l'acide folique a été lié aux médicaments à faible poids moléculaire et aux complexes macromoléculaires en tant que moyens de cibler les cellules cancéreuses. La conjugaison de l'acide folique aux macromolécules a démontré une augmentation de la livraison de macromolécules aux cellules cancéreuses exprimant le récepteur de l'acide folique *in vitro* (Turk *et al.* 2004). L'acide folique complexé au liposome a été utilisé pour cibler les cellules cancéreuses *in vitro* par Turk *et al.* (Turk *et al.* 2004). Cette étude porte sur la distribution des liposomes-folate dans un modèle de souris de cancer ovarien exprimant le récepteur folate. Les résultats démontrent que l'internalisation de l'acide folique conjugué aux liposomes a augmenté de manière significative dans les cellules cancéreuses ovariennes et les macrophages associés aux tumeurs dans le liquide d'ascite tumoral. Comparativement aux cellules cancéreuses ovariennes, les macrophages ont acquis dix fois plus de liposomes, et approximativement 50% de cette internalisation était médiée par le récepteur folate. Ces résultats démontrent que le folate, conjugué aux liposomes, peut être utile pour cibler des macrophages associés aux tumeurs *in vivo* avec des médicaments (Turk *et al.* 2004).

Il a été récemment démontré que le folate conjugué aux liposomes contenant le doxorubicine sont plus efficaces que les liposomes seules dans le traitement de la leucémie murine exprimant le récepteur folate (Pan *et al.* 2002). Il a été récemment démontré que des macrophages activés peuvent efficacement être ciblés *in vivo* par les conjugués foliques (Turk *et al.* 2002). De plus, dans le cas du carcinome ovarien, l'ascite de tumeur qui s'accumule dans la cavité péritonéale des femmes avec la

maladie avancée se compose des cellules tumorales et des cellules inflammatoires comprenant les macrophages, qui ont été impliqués dans la progression de la maladie (Sheid 1992; Zavadova *et al.* 1999). Donc, le cancer ovarien peut en partie être traité avec un médicament conjugué avec l'acide folique ciblant les macrophages activés dans la cavité péritonéale.

Chapitre 4. Matériels et méthodes

Dans ce chapitre, le matériel utilisé ainsi que la méthode suivie seront présentés. La première partie présente la conjugaison de l'acide folique au chitosan, la complexation avec l'ADN du chitosan et de l'acide folique-chitosan. Dans la deuxième partie, il sera question de la caractérisation des complexes et des études de biocompatibilité avec des cellules *in vitro*.

4.1 Conjugaison de l'acide folique au chitosan

Le chitosan utilisé dans ce projet provient de la compagnie Fluka Biokemica (Buchs, Suisse). Celui-ci a un poids moléculaire de 150 kDa et a un degré de déacétylation de 85%. L'hydrochloride 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC), l'acide folique et le diméthyl sulfoxide anhydre (DMSO) proviennent de la compagnie Sigma-Aldrich (St Louis, Mo, Etats-Unis). Le monosodium phosphate (NaH_2PO_4) et le disodium phosphate (Na_2HPO_4) ont un poids moléculaire de 137.99 g/mol et 268.04 g/mol respectivement.

4.1.1. La solution de chitosan 0.1% (p/v)

Tout d'abord 0.1 g de chitosan sont mis dans 25ml d'une solution d'acide acétique de 5mM. Pour permettre une bonne dissolution, cette solution est légèrement chauffée

tout en continuant l'agitation. Lorsque le chitosan est complètement dissout, l'eau nanopure est ajoutée à la solution pour avoir un volume total de 100 ml.

4.1.2. Préparation de la solution tampon phosphate 0.05M

Tout d'abord, 6.8699 g de NaH_2PO_4 et 13.40 g de Na_2HPO_4 sont dissout chacun dans un litre d'eau nanopure séparément. La solution de Na_2HPO_4 est ajoutée à la solution de NaH_2PO_4 jusqu'à l'obtention d'une solution de pH de 7.4. Pour obtenir une concentration de 0.05 M, 0.5L de la solution obtenue est complété avec de l'eau nanopure pour obtenir un volume total de 4 litres.

4.1.3. Conjugaison de l'acide folique au chitosan

L'acide folique (0.55838 g) sont dissout dans 10 ml de DMSO. Lorsque cette solution est complètement dissoute, 0.49915g de l'hydrochloride 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC) sont ajoutés à seulement 2 ml de la solution. Cette solution est ensuite mélangée à la température de la pièce jusqu'à l'obtention d'une solution claire. La solution de l'acide folique-EDC est rajoutée à 25ml de la solution de chitosan 0.1% p/v. Ensuite, le pH a été ajusté à 4.7. Pour s'assurer que le pH est stabilisé, il a été vérifié pendant les trois premières heures. L'acide folique est sensible à la lumière, il faut que la solution soit enveloppée avec du papier d'aluminium à l'abri de la lumière. La solution a été incubée dans le noir pendant 16 heures. Après les 16 heures d'incubation, le pH est ajusté au pH 9 par

l'addition du NaOH dilué pour pouvoir faire la dialyse de la solution contre un tampon phosphate pH 7.4 pendant 3 jours (le tampon est changé 3 fois par jour environ). Une autre dialyse a été faite contre de l'eau nanopure pendant 3 jours (l'eau est changée 3 fois par jour environ). À la fin de la dialyse, les échantillons sont congelés dans des tubes de 50 ml pendant 24 heures à -20°C . Après les 24 heures d'incubation, les échantillons congelés sont lyophilisés (figure 4.1).

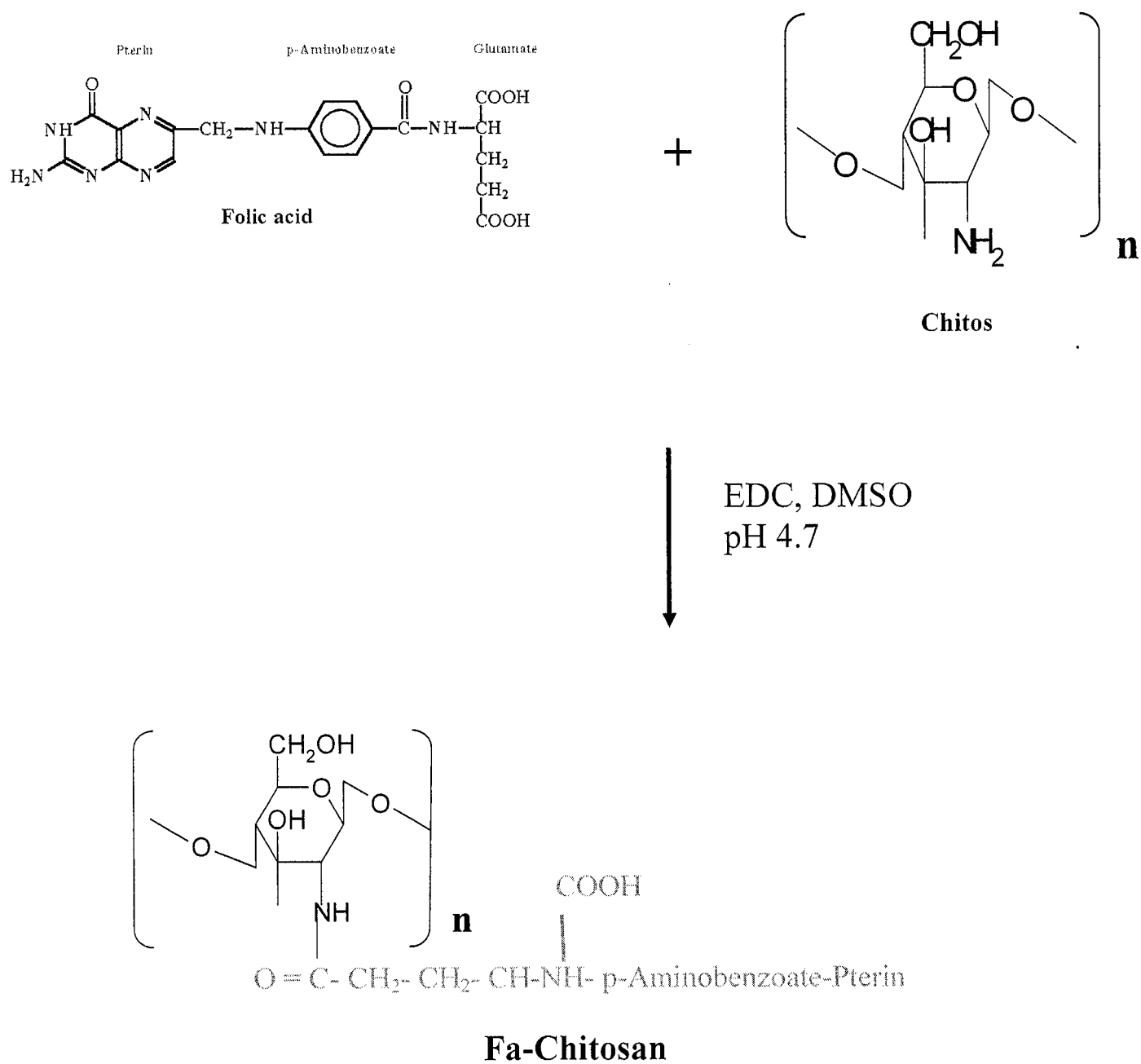


Figure 4.1. Synthèse de l'acide folique conjugué au chitosan

4.2 Synthèse des complexes chitosan-ADN et folate-chitosan-ADN

4.2.1 Préparation des solutions de chitosan et folate-chitosan 0.1% p/v

Pour préparer les solution de 0.1% de chitosan et de folate-chitosan, 0.1 g de chitosan et folate-chitosan sont mises dans 25ml d'une solution d'acide acétique de 5mM filtrée avec un filtre 0.22 μm . Pour permettre une bonne dissolution, les solutions sont chauffées légèrement tout en continuant l'agitation. Lorsque les solutions de chitosan et le folate-chitosan sont dissoutes, elles sont complétées avec de l'eau nanopure pour avoir un volume total de 100ml. Finalement les solutions sont filtrées avec un filtre de 0.22 μm .

4.2.2 Isolation de l'ADN plasmidique

Le plasmide utilisé dans ce projet est le VR1412 (Vical Inc. San Diego, Californie). Il est composé de 8165 paires de bases avec le promoteur CMV. Il contient le gène qui le rend résistant à la kanamycine et le gène marqueur lacZ qui produit l'enzyme lysosomal β -galactosidase *E-coli* (β -gal) qui est importante dans l'hydrolyse des lipides. Ce plasmide permet de vérifier l'expression du gène marqueur de la β -galactosidase *in vitro*.

Les plasmides sont isolés à l'aide de colonne permettant l'échange anionique par effet de gravité de la compagnie Qiagen (Mississauga, ON, Canada). La procédure est telle

que fournie par la compagnie. L'ADN obtenu est resuspendu dans l'eau stérile pour mesurer sa concentration par absorption UV à 260 nm. La solution finale est ajustée à une concentration de 1 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$, et elle est gardée à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'intégrité du plasmide est visualisée par électrophorèse sur un gel d'agarose de 0.08%, avec un potentiel de 80 V pendant 60 minutes. L'ADN est marqué avec le bromure d'éthidium (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

4.2.3. Préparation de l'ADN plasmidique pour la complexation avec le chitosan et F-chitosan

L'ADN plasmidique est préparé une solution de sulfate de sodium 4.3 mM filtrée avec un filtre de 0.22 μm pour la synthèse des nanoparticules. Le sodium sulfate permet une meilleure interaction entre le chitosan, folate-chitosan et l'ADN par son habilité d'attirer l'eau. La concentration finale de l'ADN est de 200 μg d'ADN / ml de sulfate de sodium.

4.2.4. Préparation des complexes de chitosan-ADN et de folate-chitosan-ADN

La synthèse des complexes est faite avec des petits volumes pour permettre une uniformité de l'interaction entre les polymères, le chitosan et le folate-chitosan avec l'ADN. De plus, cette synthèse est réalisée sous la hotte stérile pour éviter la contamination des nanoparticules synthétisées. La première étape est de mettre 100 μl de chitosan ou de folate-chitosan dans des tubes d'Eppendorf qui sont chauffés à 55

°C. La solution d'ADN est chauffée seulement 1 minute avant la synthèse dans le bain marie à 55 °C. Les tubes contenant les solutions chitosan ou le folate-chitosan sont agités sur le vortex, 100 µl d'ADN sont ajoutés goutte à goutte aux tubes de synthèse tout en vortexant. Les tubes sont ensuite vortexés à vitesse maximale pendant une minute et vortexés pendant deux heures à une faible vitesse. Les solutions finales des nanoparticules produites ont été employées pour leur caractérisation sans d'autres modifications.

4.3. Évaluation de l'intégrité de l'ADN plasmidique suite à la synthèse

Pour évaluer l'intégrité de l'ADN contenu dans les nanoparticules de chitosan et folate-chitosan suite à la synthèse, il doit être extrait de ces complexes. La chitosanase (Sigma, St. Louis, MO, USA) et le lysozyme (Bioshop Canada, Burlington, ON, Canada) peuvent digérer le chitosan et ainsi libérer l'ADN contenu dans les complexes (Mao et al., 2001). La digestion se fait avec 50 µl des nanoparticules de chitosan-ADN et de folate-chitosan-ADN dans des Eppendorfs incubées avec 40 µl chitosanase (0.625U/ml de 50mM NaAc-HOAc, pH 5.5) et 10 µl lysozyme (1000U/ml de 50mM NaAc-HOAc, pH 5.5) durant 4 heures à 37 °C. Les échantillons des nanoparticules intacts et digérés et l'ADN seul sont évalués par électrophorèse sur un gel d'agarose de 0.8% dans le tampon tris-borate EDTA, pH 8.0 à 80V pendant 60 minutes et marqué avec le bromure d'éthidium.

4.4. Études de caractérisation

4.4.1. L'effet du ratio de charge N/P sur des propriétés des nanoparticules chitosan-ADN et Fa-chitosan-ADN

Le ratio des groupements amines versus les groupements phosphate est défini comme le ratio de charge N/P. Le potentiel zêta permet la mesure de la charge extérieure globale des nanoparticules, qui représente un facteur critique dans leur interaction avec la membrane cellulaire. Cette étude a été réalisée en utilisant un Malvern Zetasizer 4 (installation de Malvern. Ltd. Malvern, R-U), en utilisant la cellule de ZET 5104. Les solutions de différents ratios de charge N/P des nanoparticules de chitosan-ADN et de Fa-chitosan-ADN ont été synthétisées pour mesurer leur taille et leur potentiel zêta. Les solutions de différents ratios ont été calculées suivant les mêmes étapes de complexation décrites ci-dessus.

4.5. Études de cytotoxicité

4.5.1. Matériel

Pour les études de cytotoxicité, la lignée cellulaire embryonnaire rénale humaine (HEK293) (ATCC, Rockville, MD, USA) a été utilisée. La culture de ces cellules est faite dans un incubateur recevant 5%-95% CO₂ à 37 °C. Le milieu de culture des cellules Hek293 employé est le MEM (*Modified Eagle Medium*) (Sigma, St. Louis,

MO, USA). Ce milieu de culture a été enrichi par 1.5 g/L de bicarbonate de sodium, 0.11 g/L d'acide pyruvique de sodium, 10% de sérum de veau fœtal désactivé par la chaleur et 1% d'antibiotique pénicilline-streptomycine

Le réactif utilisé est le MTT (3-(4,5 *dimethylthiazole-2-yl*)-2,5 *triphenyl tetrazolium bromide*) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Ce réactif permet de déterminer la viabilité cellulaire par une coloration jaune des cellules vivantes.

4.5.2. Méthode

La viabilité cellulaire est déterminée en incubant les cellules avec les nanoparticules. Pour ce faire, 50 000 cellules contenues dans 1 ml de milieu de culture sont mises dans chacun des puits d'une plaque de 12 puits. Le lendemain, le milieu de culture dans les puits est remplacé par 0.5 ml de milieu contenant soit 10 µg d'ADN plasmidique, soit des complexes de folate-chitosan-ADN ou de chitosan-ADN. Pour le contrôle négatif, il n'y a rien qui a été ajouté dans les puits. Tandis que pour le contrôle positif, la lipofectamineTM 2000 a été utilisée selon les instructions du manufacturier. Le milieu contenu dans les puits est remplacé par un milieu complet le lendemain. La viabilité cellulaire est déterminée 60 heures post-incubation

Pour réaliser le test de MTT, le milieu de culture est remplacé par 0.1ml d'une solution contenant 5mg/ml de MTT dans un volume final de 1 ml de milieu de culture complet. Les cellules sont incubées 3 à 4 heures à 37 °C. Après ce temps d'incubation, le surnageant est éliminé et les cellules sont incubées pendant 5-10 minutes sur la glace avec 200µl d'isopropanol acide (0.1 N HCl dans l'isopropanol absolu). Incuber à 37 °C pendant 5-10 minutes. L'isopropanol acide est ajouté pour dissoudre les cristaux bleus qui ont été formés par les cellules ayant un métabolisme cellulaire. Le contenu de chaque puits est collecté et mis dans une plaque de 96 puits pour mesurer la densité optique à 570 nm. La viabilité mesurée dans le contrôle négatif est considérée comme 100%.

4.6. Analyses statistiques

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de tableau et/ou de graphiques comme la moyenne $\pm$ l'écart-type. Les analyses statistiques ont été accomplies par ANOVA simple. Une valeur de $p \leq 0.05$ est considérée comme statistiquement significative.

Chapitre 5. Résultats

Dans ce chapitre, les résultats obtenus seront présentés. Les expériences ont été répétées 3 fois (n=3).

5.1. Effet du rapport de charge N/P sur la taille des nanoparticules chitosan-ADN.

Nous avons évalué l'effet du rapport de charge N/P sur la taille des nanoparticules chitosan-ADN (figure 5.1). À un ratio de charge N/P de 2, la taille des nanoparticules est de 256 nm. Plus le rapport de charge N/P augmente plus la taille des nanoparticules diminue. À un rapport de charge de 18 la taille des nanoparticules est de 218 nm. La courbe de tendance montre que la taille des nanoparticules chitosan-ADN est indirectement proportionnelle au rapport de charge avec un R^2 de 0.9837.

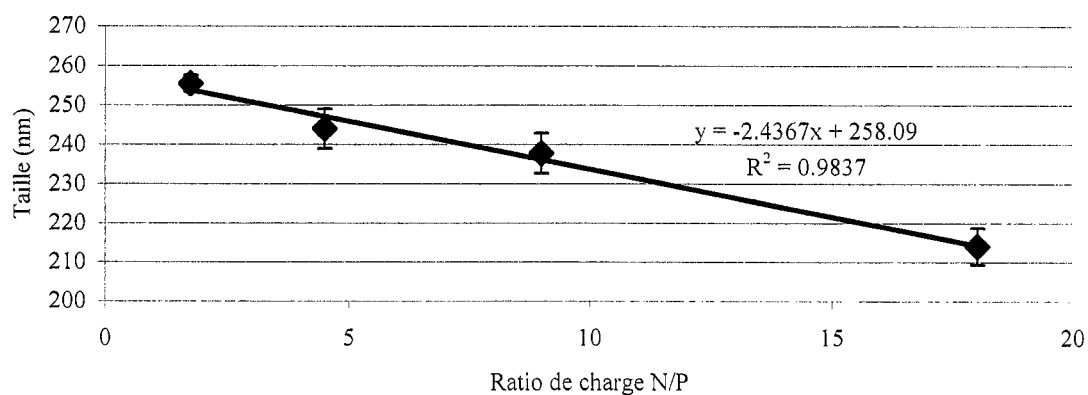


Figure 5.1 Effet du ratio de charge N/P sur la taille des nanoparticules chitosan-ADN. Cette analyse a été réalisée en utilisant le Malvern Zetasizer 4 avec la cellule ZET 5104 comme décrit dans *Matériel et Méthodes*.

5.2. Effet du rapport de charge N/P sur le potentiel zêta des nanoparticules chitosan- ADN.

L'effet du rapport de charge N/P a été évalué sur le potentiel zêta des nanoparticules chitosan-ADN (figure 5.2). À un ratio de charge N/P de 2, le potentiel zêta des nanoparticules est de + 15.6 mV. Plus le rapport de charge N/P augmente, plus le potentiel zêta des nanoparticules augmente aussi. À un rapport de charge de 18 le potentiel zêta des nanoparticules est de + 21.6 mV. La courbe de tendance montre que le potentiel zêta des nanoparticules chitosan-ADN est directement proportionnel au rapport de charge avec un R^2 de 0.9579.

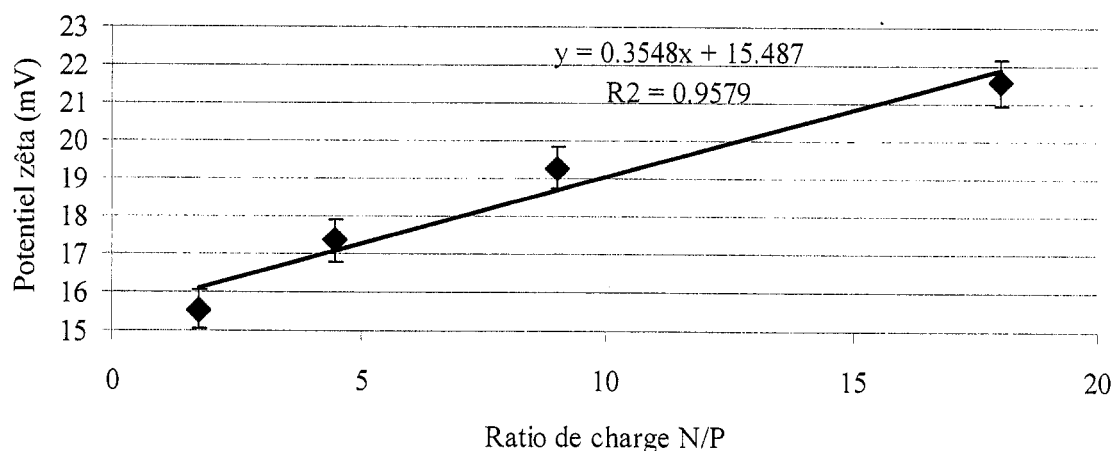


Figure 5.2 Effet du ratio de charge N/P sur le potentiel zêta des nanoparticules chitosan-ADN. Cette analyse a été réalisée en utilisant le Malvern Zetasizer 4 avec la cellule ZET 5104 comme décrit dans *Matériel et Méthodes*.

5.3. Effet du rapport de charge N/P sur la taille des nanoparticules Fa-chitosan-ADN.

Nous avons aussi évalué l'effet du rapport de charge N/P sur la taille des nanoparticules Fa-chitosan-ADN (figure 5.3). Lorsque le rapport de charge des nanoparticules Fa-chitosan-ADN est autour de 1, la taille des nanoparticules est plus de 300 nm. La taille des nanoparticules diminue à peu près à 118 nm au rapport de charge de 7. À partir du rapport de charge N/P de 7, la taille des nanoparticules est proche de 118 nm et reste stable jusqu'au rapport de charge de 14.

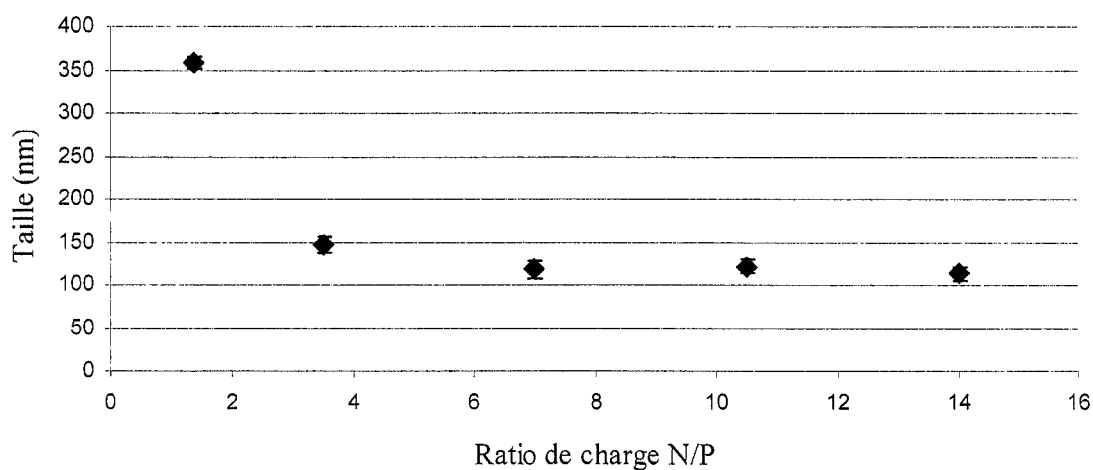


Figure 5.3 Effet du ratio de charge N/P sur la taille des nanoparticules Fa-chitosan-ADN. Cette analyse a été réalisée en utilisant le Malvern Zetasizer 4 avec la cellule ZET 5104 comme décrit dans *Matériel et Méthodes*.

5.4. Effet du rapport de charge N/P sur le potentiel zêta des nanoparticules Fa-chitosan- ADN.

Le rapport de charge N/P en fonction du potentiel zêta des nanoparticules Fa-chitosan-ADN est illustré à la figure 5.4. Au rapport de charge N/P de 0.75 le potentiel zêta est près de -32 mV. Le potentiel zêta augmente pour atteindre 0 mV au rapport de charge N/P de 1.5. Le potentiel zêta continue à augmenter pour atteindre $+13$ mV au rapport de charge N/P de 7. Notez que lorsque le rapport de charge (N/P) dépasse 7, le potentiel zêta atteint un plafond autour de $+13$ mV.

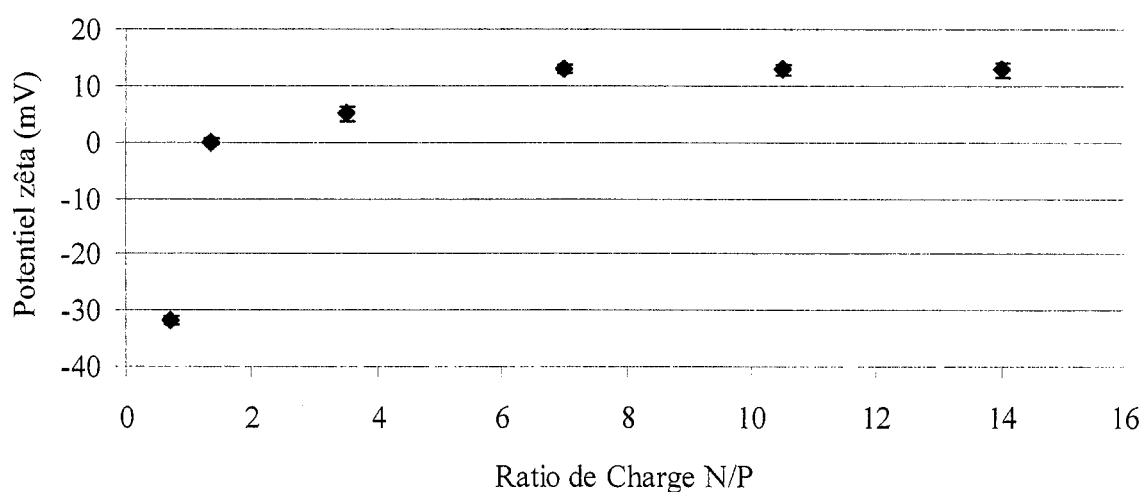


Figure 5.4 Effet du ratio de charge N/P sur le potentiel zêta des nanoparticules Fa-chitosan-ADN. Cette analyse a été réalisée en utilisant le Malvern Zetasizer 4 avec la cellule ZET 5104 comme décrit dans *Matériel et Méthodes*.

5.5. Intégrité de l'ADN

Avec un gel d'électrophorèse, nous avons évalué la condensation du plasmide ainsi que son intégrité (la figure 5.5). Dans le puits 1 de la figure 5.5, deux bandes sont visibles représentant le plasmide seul intact utilisé pour la complexation avec le chitosan et le Fa-chitosan. Dans le puits 2, les nanoparticules chitosan-ADN restent dans le puits de chargement du gel et ne migrent pas. Il n'y a aucune bande visible dans ce puits. Après digestion des nanoparticules chitosan-ADN avec la chitosanase et le lysozyme, l'ADN a été libéré des nanoparticules et a pu migrer dans le puits 4. Dans ce puits, on retrouve les deux bandes correspondant au plasmide, et aucun signe de sa dégradation n'est visible.

L'effet des conditions de synthèse utilisées et le lien covalent de Fa avec le chitosan ont été évalués sur l'intégrité du plasmide d'ADN par la même méthode. Dans les puits 3-3a, il n'y a aucune trace de migration du plasmide. Dans ces puits, les nanoparticules Fa-chitosan-ADN ne migrent pas et restent dans les puits de chargement du gel. Après digestion des nanoparticules Fa-chitosan-ADN avec la chitosanase et le lysozyme, l'ADN a été libéré des nanoparticules et a pu migrer dans les puits 5-5a. On retrouve les deux bandes correspondant au plasmide dans les puits 5-5a, et aucun signe de sa dégradation n'est visible.

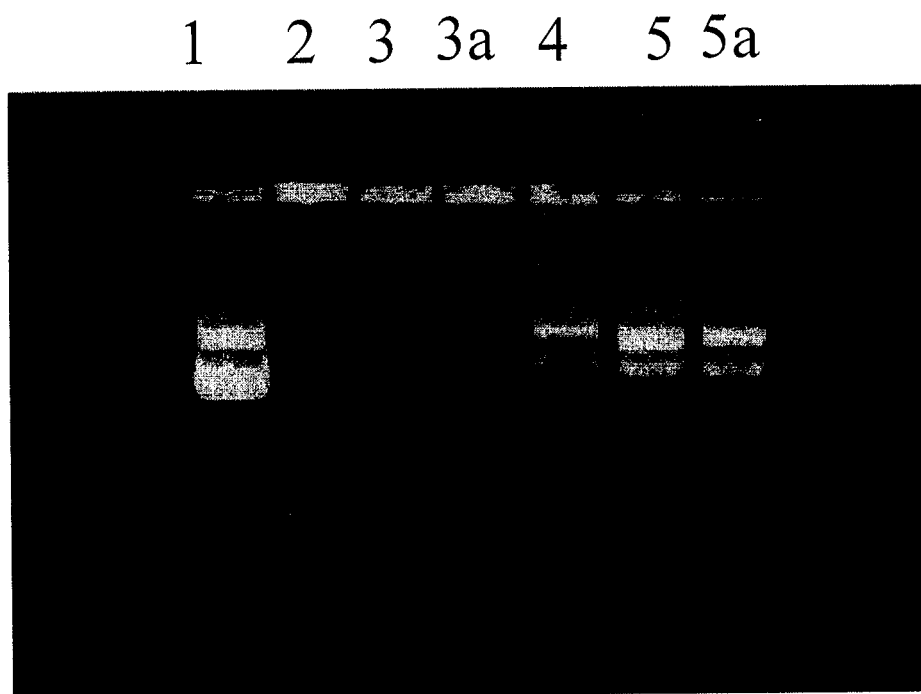


Figure 5.5 Analyse de la mobilité électrophorétique des nanoparticules chitosan-ADN et FA-chitosan-ADN pour déterminer l'intégrité du plasmide. Les nanoparticules sont digérées avec la chitosanase et les lysozymes après leur synthèse. L'ADN relâché est visualisé sur un gel d'agarose de 0.8% marqué avec le bromure d'éthidium. Puits 1: plasmide VR1412 ; puits 2: nanoparticules chitosan-ADN; puits 3, 3a: nanoparticules FA-chitosan-ADN; puits 4: puits 2 + digestion; puits 5: puits 3 + digestion, puits 5a: puits 3a + digestion.

5.6. La toxicité cellulaire

Lorsque les cellules HEK293 sont incubées avec 10µg d'ADN seule, la viabilité cellulaire demeure à peu près la même (96%) que chez les cellules qui ne sont pas transfectées (100%). Il y a une faible diminution de la viabilité quand les cellules sont incubées avec 10 µg des nanoparticules chitosan-ADN (77%) et Fa-chitosan-ADN (79%). D'autre part, 10 µg du lipoplexe ADN-LipofectAMINETM2000 diminue la viabilité cellulaire en-dessous de 30% (figure 5.6).

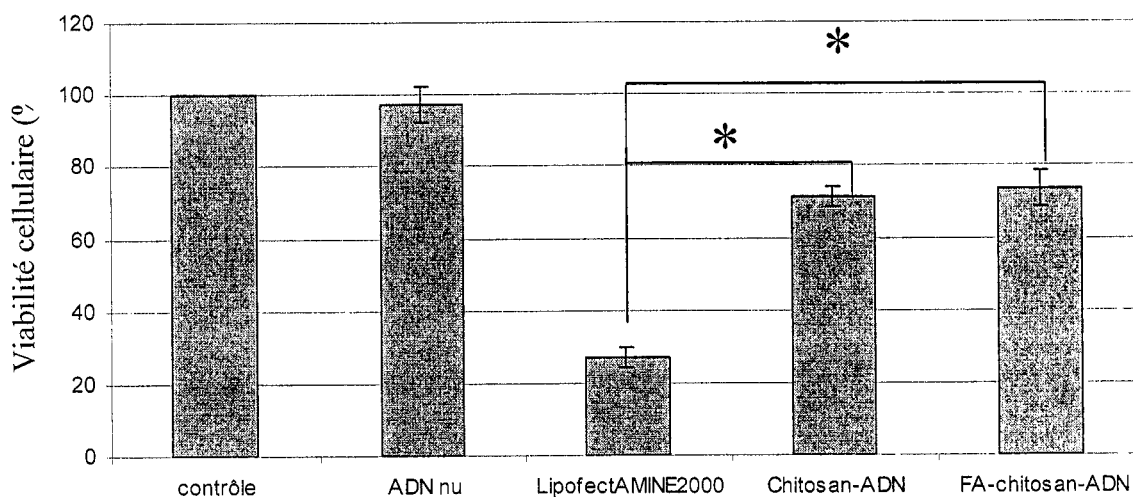


Figure 5.6 : La viabilité des cellules HEK293 transfectées avec 10µg de FA-chitosan-ADN, chitosan-ADN, LipofectAMINETM2000-ADN, ADN seul et les cellules non traitées (contrôle). La viabilité des cellules non-traitées est arbitrairement définie comme 100%. * : $p < 0.05$

Chapitre 6. Discussion

Ces dernières années, la technologie de transfert de gène a évolué à un taux croissant (Evans *et al.* 2000; Evans *et al.* 2004), mais le développement des systèmes non-viraux efficaces de livraison de gène reste à améliorer (Fernandes *et al.* 1999; Fernandes *et al.* 2000). Une stratégie pour assurer une bonne efficacité et sécurité des systèmes de transfection est de se concentrer sur les polymères cationiques biocompatibles et biodégradables ayant des groupements aminés, tels que le chitosan, pour permettre une liaison électrostatique avec les groupements phosphate de l'ADN qui sont chargés négativement. Le chitosan facilite le trafic intracytoplasmatique au noyau en échappant aux systèmes endosomal et lysosomal. Le récepteur de l'acide folique maintient une grande affinité à son ligand même si celui-ci est lié covalentement par l'intermédiaire de son groupe γ -carboxylique à une molécule étrangère (Sudimack and Lee 2000). La transfection médiée par l'acide folique permet une meilleure internalisation de l'ADN dans la cellule par l'intermédiaire des récepteurs membranaires de l'acide folique *in vitro* et *in vivo* (Sudimack and Lee 2000). La synthèse des nanoparticules Fa-chitosan-ADN capables de transférer efficacement des gènes pourrait devenir une stratégie très attrayante à faible coût et à rendement de transfection élevé pour un vecteur non-viral.

L'acide folique a été employé par beaucoup de chercheurs comme ligand avec des liposomes cationiques et d'autres polymères pour cibler les cellules exprimant le

récepteur folique. Par l'exemple, Guo et al. a montré que l'acide folique augmente l'activité de transfection médié par le polyéthylèneimine (PEI) en présence de sérum dans les cellules de mammifères en culture (Guo and Lee 2001). L'équipe de Reddy et al. a prouvé que l'endocytose médié par le folate peut être exploité pour cibler des transgènes aux cellules cancéreuses exprimant le récepteur folique et que le DOPANT dérivé de l'acide folique ont une activité élevée de transfection (Reddy *et al.* 2002).

Dans cette expérience, la taille et le potentiel zêta des nanoparticules chitosan-ADN et les nanoparticules Fa-chitosan-ADN ont été évalués en fonction du ratio de charge N/P. Sur la figure 5.1, la taille des nanoparticules chitosan-ADN est indirectement proportionnelle au ratio de charge N/P, alors que dans la figure 5.2 leur potentiel zêta est directement proportionnel au ratio de charge N/P comme précédemment rapporté (Mao *et al.* 2001). Dans la figure 5.3, lorsque le ratio de charge des nanoparticules Fa-chitosan-ADN est autour de 1, la taille des nanoparticules est plus de 300 nm. Si le ratio de charge augmente, la taille des nanoparticules diminue et devient près de 118 nm. Dans la figure 5.4, au ratio de charge de 1 le potentiel zêta est zéro, mais quand le ratio de charge dépasse 7 le potentiel zêta demeure stable à + 13 mV.

Deux propriétés sont nécessaires pour assurer l'internalisation des nanoparticules par des cellules : la charge de surface (ou potentiel zêta) et la taille. Une charge de surface positive permet une interaction électrostatique entre les membranes cellulaires négativement chargées et les nanoparticules positivement chargées. Pour augmenter

l'endocytose par les cellules, la taille des nanoparticules devrait être autour de 100 nm ou moins (Wolfert and Seymour 1996). Notre équipe a précédemment démontré que les complexes chitosan-ADN semblent sphériques avec des tailles moyennes de 100 nm et une distribution homogène de l'ADN dans la particule (Corsi *et al.* 2003). La taille des complexes est d'une importance cruciale pour l'internalisation cellulaire. Illum *et al.* ont synthétisé des nanoparticules chitosan-ADN s'étendant de 20 à 500 nm (Illum *et al.* 2001). Les complexes de plus petite taille ont l'avantage d'entrer dans les cellules par endocytose et/ou par pinocytose, augmentant ainsi le taux de transfection. Pour que l'endocytose puisse être possible par des cellules non spécialisées, la taille des complexes ne doit pas dépasser 100 nm (Erbacher *et al.* 1998).

La liaison covalente de l'acide folique au chitosan améliore les caractéristiques des nanoparticules en réduisant leur taille tout en gardant un ratio de charge positif supérieur à +2. Un potentiel zêta positif des nanoparticules chitosan-ADN et Fa-chitosan-ADN permet d'améliorer l'interaction à la surface cellulaire membranaire et permet ainsi une internalisation plus efficace par les cellules.

Les études de Gao *et al.* proposent une utilisation du chitosan de faible poids moléculaire (LMWCs) comme un vecteur modifié pour la thérapie génique dans différentes lignées cellulaires (Gao *et al.* 2003). Le LMWCs galactolysé (Gal-LMWCs) était préparé et complexé avec des plasmides contenant le gène rapporteur du β -galactosidase (β -gal). Le complexe chitosan/ADN a été préparé en utilisant le processus de coacervation.

L'efficacité de transfection a été évaluée et comparée aux méthodes de transfection de lipofectamine et de calcium phosphate (CaP). Les résultats ont prouvé que l'efficacité de transfection augmente quand le rapport des groupements amines du chitosan/groupements phosphate de l'ADN (N/P) augmente de 0.94:1 à 5.6:1, avec un taux de transfection maximale à un rapport de N/P de 5.6:1. Les capacités des complexes de Gal-LMWCs/ADN de transfecter plus efficacement les hépatocytes humains (HepG2, L-02 et SMMC-7721) que les cellules Hela indiquent que les vecteurs Gal-LMWC transfectent sélectivement les hépatocytes par endocytose médiée par un récepteur. Comparée à d'autres vecteurs, l'efficacité de transfection du complexe de Gal-LMWC/ADN dans les cellules HepG2 est plus grande que celle de l'ADN seule, du CaP/DNA, des complexes de HMWC/ADN, de LMWC/ADN, mais inférieur à celle de la lipofectin/ADN (Gao *et al.* 2003).

La condensation de l'ADN plasmidique a été évaluée sur un gel d'électrophorèse. La figure 5.5 montre un ADN intact, avant la synthèse (puits 1). L'ADN dans les puits 2 et 3-3a ne peut pas migrer et reste dans les puits de chargement de gel, indiquant un attachement fort de l'ADN au chitosan et à Fa-chitosan. D'ailleurs, dans ces puits, il n'y a aucune trace de l'ADN seul confirmant l'attachement fort avec le chitosan et le Fa-chitosan comme précédemment rapporté (Corsi *et al.* 2003). Ceci suggère également que la liaison covalente de l'acide folique avec le chitosan n'a pas affecté sa complexation électrostatique avec l'ADN.

Le principe de base de l'utilisation des polycations pour la livraison d'ADN est que les polycations et l'ADN ayant des charges opposées vont interagir pour former des complexes. Ces complexes ont une taille nanométrique et permettent l'encapsulation de l'ADN pour la protéger contre l'activité de nucléase qui peut dégrader l'ADN (en quelques secondes dans le sang, par exemple) (Dash *et al.* 1999). L'ADN plasmidique complexé avec le chitosan et le Fa-chitosan doit rester intact pour assurer sa fonctionnalité une fois à l'intérieur de la cellule. Des études précédentes par notre groupe ont démontré que le chitosan protège l'ADN contre la dégradation de nucléase (Corsi *et al.* 2003).

Après la digestion des nanoparticules avec la chitosanase et le lysozyme, l'ADN plasmidique a été libéré du chitosan et a pu être identifié dans les puits 4 et 5-5a. Comme précédemment rapporté, le plasmide est intact et ne montre aucun signe de dégradation (Mao *et al.* 2001). Ceci suggère que les conditions de synthèse utilisées et la liaison covalente de l'acide folique avec le chitosan n'ont pas affecté l'intégrité de l'ADN condensé. Théoriquement, ces complexes Fa-chitosan-ADN stables seront emprisonnés dans des endosomes et transférés aux lysosomes pour qu'ils soient dégradés. On pense que des systèmes non viraux tels que le PEI et le chitosan vont s'ioniser au pH acide près de leur pKa (état d'ionisation autour de pKa 5-7 pour le chitosan) pour augmenter le pH endosomal et pour faire éclater l'endosome (Kichler *et al.* 2001; Merdan *et al.* 2002).

Dans le cytoplasme des cellules qui ne sont pas en division, l'ADN plasmidique relativement large ne diffuse pas (Escriou *et al.* 2003; Lukacs *et al.* 2000), et il est possible qu'une partie des vecteurs polycationiques condensent l'ADN plasmidique et le dirige vers le noyau à travers les pores nucléaires des cellules (Hebert 2003). Une fois à l'intérieur du noyau, l'ADN plasmidique est épisomal mais peut répliquer dans la cellule. L'ADN plasmidique peut se dissocier de son polycation dans le noyau, toutefois il a été démontré que la présence du polycation n'empêche pas nécessairement la transcription (Bieber *et al.* 2002).

Il a été précédemment démontré que le chitosan est non toxique dans une gamme d'essais de toxicité, *in vitro* (Corsi *et al.* 2003) et dans des expériences chez les animaux (Rao and Sharma 1997). Dans cette étude, l'effet des nanoparticules Fa-chitosan-ADN sur la viabilité des cellules HEK293 a été déterminé avec le test MTT et comparé à l'ADN seul, aux nanoparticules chitosan-ADN et à la lipofectAMINETM2000. Comme illustré dans la figure 5.6, quand les cellules HEK293 sont incubées avec 10µg de l'ADN seule, il n'y a aucun changement crucial de la viabilité cellulaire comparée avec le contrôle. On observe une légère diminution de la viabilité cellulaire lorsque les cellules sont incubées avec 10µg d'ADN contenu dans les nanoparticules chitosan-ADN et Fa-chitosan-ADN, sans une différence significative entre les nanoparticules Fa-chitosan-ADN et les nanoparticules chitosan-ADN (figure 5.6). Comparées à la lipofectAMINETM2000, qui a réduit la viabilité cellulaire jusqu'à 30%, les nanoparticules chitosan-ADN et Fa-chitosan-ADN montrent une faible cytotoxicité. Les études de viabilité cellulaire par d'autres

groupes suivant une incubation avec des nanoparticules ont confirmé la faible toxicité du chitosan comparé aux lipides cationiques tels que la lipofectamine qui est une méthode commerciale de transfection lipidique (Corsi *et al.* 2003; Sato *et al.* 2001; Thanou *et al.* 2002). Le chitosan à poids moléculaire élevé (HMWC) et le LMWC se sont avérés moins cytotoxiques par rapport à la lipofectamine et au CaP dans les cellules HepG2 et Hela (Gao *et al.* 2003).

Les nanoparticules FA-chitosan-ADN ont été testées sur des monocytes provenant d'un donneur sain. Ces cellules n'expriment pas le récepteur folate. Il n'y a pas d'expression du gène marqueur de la β -galactosidase dans les monocytes transfectés avec les nanoparticules FA-chitosan-ADN. Ce qui est un résultat attendu puisque ces nanoparticules sont spécifiques aux cellules exprimant le récepteur folate. Des cellules exprimant le récepteur folate ont été commandé pour faire les études de transfection. Par contre, ces cellules ont été bloquées à la douane pour une durée de 6 mois ce qui nous a empêché de faire les expériences de transfection. En exploitant la présence de récepteurs d'une grande affinité ($FR\alpha$ et $FR\beta$) pour l'acide folique à la surface membranaire des cellules, l'ADN peut être ciblé et livré aux cellules présentant une anomalie tout en évitant leur internalisation dans les cellules normales. Puisque les conjugués Fa-chitosan-ADN ne peuvent pas passer à travers les transporteurs membranaires de faible affinité, cette technique est fortement spécifique et versatile pour être appliquée à une grande variété de médicaments et de maladies (Sudimack and Lee 2000), tels que les cellules cancéreuses et les macrophages activés dans l'arthrite rhumatoïde surexpriment les

récepteurs foliques (Nakashima-Matsushita *et al.* 1999; Sudimack and Lee 2000). Les macrophages activés sont responsables de la progression des maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, le psoriasis, le colitis ulcéraire, et le lupus (Mansouri *et al.* 2004; Sudimack and Lee 2000). Chacune de ces maladies auto-immunes impliquant les macrophages activés représente une occasion potentielle pour la livraison ciblée de médicaments.

Chapitre 7. Conclusion et perspectives

Comme décrit dans ce mémoire, plusieurs vecteurs non-viraux, y compris les polymères cationiques, ont été développés pour la livraison d'ADN. L'efficacité de transfection peut dépendre de plusieurs facteurs tels que la structure chimique des polycations, la taille et la composition des complexes, l'interaction entre les cellules et les complexes et le type de cellules. Un de ces polymères cationiques, le chitosan, est considéré comme l'un des meilleurs candidats pour la thérapie génique. Un certain nombre d'études *in vitro* et *in vivo*, y compris la nôtre, ont montré que le chitosan est un matériau approprié pour la thérapie génique non virale efficace. Plusieurs groupes, y compris le nôtre, entreprennent des études en utilisant les différentes stratégies qui peuvent être liées aux nanoparticules chitosan-ADN pour un meilleur taux de transfection.

Au meilleur de notre connaissance, nous sommes la première équipe à rendre compte de la synthèse de nanoparticules Fa-chitosan-ADN pour la thérapie génique non virale. Ce projet a fait l'objet d'une demande de brevet aux États-Unis et au Canada. Les #nanoparticules chitosan-ADN et Fa-chitosan-ADN montrent une très faible cytotoxicité. Les conditions de synthèse que nous décrivons dans ce mémoire n'ont pas affecté l'intégrité de l'ADN condensée et complexée au Folate-chitosan et chitosan. Des nanoparticules près de 118 nm de taille et un potentiel zêta positif sont deux importantes caractéristiques pour permettre l'interaction des nanoparticules avec les membranes

cellulaires et permettre leur endocytose. D'ailleurs, la conjugaison de l'acide folique au chitosan n'a pas affecté les propriétés des nanoparticules. Les nanoparticules-Folate sont un candidat prometteur pour la thérapie génique non virale dans le cancer et les maladies inflammatoires médiée par le récepteur de l'acide folique.

Les prochaines étapes de ce projet serait de tester les nanoparticules *in vitro* avec des cellules surexprimant le récepteur folate. Ensuite, il faudrait optimiser la technique de transfection avec ces nouvelles nanoparticules. Une autre étape serait d'étudier le cheminement des nanoparticules à l'intérieur de la cellule soit du cytoplasme jusqu'au noyau. Ceci pourrait être fait avec des marqueurs fluorescents qui marquent l'ADN et le folate-chitosan. Ainsi, il serait possible de visualiser la localisation des nanoparticules dans la cellule et de savoir s'il y a une étape quelconque qui empêcherait l'expression de l'ADN.

Références

ABE, N., LEE, Y. P., SATO, M., ZHANG, X., WU, J., MITANI, K., LIEBERMAN, J. R. (2002). Enhancement of bone repair with a helper-dependent adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2. Biochem. Biophys. Res. Commun., 297, 523-527.

ANTONY, A. C. (1996). Folate receptors. Annu. Rev. Nutr., 16, 501-521.

AUDOUY, S. A., DE LEIJ, L. F., HOEKSTRA, D., MOLEMA, G. (2002). In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. Pharm. Res., 19, 1599-1605.

BEHR, J. P. (1994). Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. Bioconjug. Chem., 5, 382-389.

BENNS, J. M., CHOI, J. S., MAHATO, R. I., PARK, J. S., KIM, S. W. (2000). pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. Bioconjug. Chem., 11, 637-645.

BIEBER, T., MEISSNER, W., KOSTIN, S., NIEMANN, A., ELSASSER, H. P. (2002). Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. J. Control Release, 82, 441-454.

BIELINSKA, A. U., YEN, A., WU, H. L., ZAHOS, K. M., SUN, R., WEINER, N. D., BAKER, J. R., JR., ROESSLER, B. J. (2000). Application of membrane-based

dendrimer/DNA complexes for solid phase transfection in vitro and in vivo. Biomaterials, 21, 877-887.

BLAESE, R. M., CULVER, K. W., MILLER, A. D., CARTER, C. S., FLEISHER, T., CLERICI, M., SHEARER, G., CHANG, L., CHIANG, Y., TOLSTOSHEV, P., et al. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. Science, 270, 475-480.

BORDIGNON, C., NOTARANGELO, L. D., NOBILI, N., FERRARI, G., CASORATI, G., PANINA, P., MAZZOLARI, E., MAGGIONI, D., ROSSI, C., SERVIDA, P., et al. (1995). Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. Science, 270, 470-475.

BOUSSIF, O., LEZOUALCH, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B., BEHR, J. P. (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, 7297-7301.

BREYER, B., JIANG, W., CHENG, H., ZHOU, L., PAUL, R., FENG, T., HE, T. C. (2001). Adenoviral vector-mediated gene transfer for human gene therapy. Curr. Gene Ther., 1, 149-162.

BROWN, M. D., SCHATZLEIN, A. G., UCHEGBU, I. F. (2001). Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. Int. J. Pharm., 229, 1-21.

CHOATE, K. A., KHAVARI, P. A. (1997). Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease. Hum. Gene Ther., 8, 1659-1665.

CORSI, K., CHELLAT, F., YAHIA, L., FERNANDES, J. C. (2003). Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. Biomaterials, 24, 1255-1264.

CUI, Z., MUMPER, R. J. (2001). Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. J. Control Release, 75, 409-419.

CZEIZEL, A. E. (2000). Primary prevention of neural-tube defects and some other major congenital abnormalities: recommendations for the appropriate use of folic acid during pregnancy. Paediatr. Drugs, 2, 437-449.

DASH, P. R., READ, M. L., BARRETT, L. B., WOLFERT, M. A., SEYMOUR, L. W. (1999). Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. Gene Ther., 6, 643-650.

DE SMEDT, S. C., DEMEESTER, J., HENNINK, W. E. (2000). Cationic polymer based gene delivery systems. Pharm. Res., 17, 113-126.

DESHPANDE, D., BLEZINGER, P., PILLAI, R., DUGUID, J., FREIMARK, B., ROLLAND, A. (1998). Target specific optimization of cationic lipid-based systems for pulmonary gene therapy. Pharm. Res., 15, 1340-1347.

DETRICK, B., NAGINENI, C. N., GRILLONE, L. R., ANDERSON, K. P., HENRY, S. P., HOOKS, J. J. (2001). Inhibition of human cytomegalovirus replication in a human retinal epithelial cell model by antisense oligonucleotides. Invest Ophthalmol. Vis. Sci., 42, 163-169.

DUBE, D., FRANCIS, M., LEROUX, J. C., WINNIK, F. M. (2002). Preparation and tumor cell uptake of poly(N-isopropylacrylamide) folate conjugate. Bioconjug. Chem., 13, 685-692.

EL-ANEED, A. (2004). An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. J. Control Release, 94, 1-14.

ERBACHER, P., ZOU, S., BETTINGER, T., STEFFAN, A. M., REMY, J. S. (1998). Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. Pharm. Res., 15, 1332-1339.

ESCRIOU, V., CARRIERE, M., SCHERMAN, D., WILS, P. (2003). NLS bioconjugates for targeting therapeutic genes to the nucleus. Adv. Drug Deliv. Rev., 55, 295-306.

EVANS, C. H., GHIVIZZANI, S. C., HERNDON, J. H., WASKO, M. C., REINECKE, J., WEHLING, P., ROBBINS, P. D. (2000). Clinical trials in the gene therapy of arthritis. Clin. Orthop., 379 Suppl, S300-S307.

EVANS, C. H., GOUZE, J. N., GOUZE, E., ROBBINS, P. D., GHIVIZZANI, S. C. (2004). Osteoarthritis gene therapy. Gene Ther., 11, 379-389.

FANG, N., CHAN, V., MAO, H. Q., LEONG, K. W. (2001). Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. Biomacromolecules, 2, 1161-1168.

FELGNER, P. L., GADEK, T. R., HOLM, M., ROMAN, R., CHAN, H. W., WENZ, M., NORTHROP, J. P., RINGOLD, G. M., DANIELSEN, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84, 7413-7417.

FENG, S. S., RUAN, G., LI, Q. T. (2004). Fabrication and characterizations of a novel drug delivery device liposomes-in-microsphere (LIM). Biomaterials, 25, 5181-5189.

FERBER, D. (2001). Gene therapy. Safer and virus-free?. Science, 294, 1638-1642.

FERNANDES, J., TARDIF, G., MARTEL-PELLETIER, J., LASCAU-COMAN, V., DUPUIS, M., MOLDOVAN, F., SHEPPARD, M., KRISHNAN, B. R., PELLETIER, J. P. (1999). In vivo transfer of interleukin-1 receptor antagonist gene in osteoarthritic rabbit knee joints: prevention of osteoarthritis progression. Am. J. Pathol., 154, 1159-1169.

FERNANDES, J. C., MARTEL-PELLETIER, J., PELLETIER, J. P. (2000). Gene therapy for osteoarthritis: new perspectives for the twenty-first century. Clin. Orthop., 379 Suppl, S262-S272.

GAO, S., CHEN, J., XU, X., DING, Z., YANG, Y. H., HUA, Z., ZHANG, J. (2003). Galactosylated low molecular weight chitosan as DNA carrier for hepatocyte-targeting. Int. J. Pharm., 255, 57-68.

GAO, X., HUANG, L. (1996). Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. Biochemistry, 35, 1027-1036.

GARNETT, M. C. (1999). Gene-delivery systems using cationic polymers. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 16, 147-207.

GILL, D. R., SOUTHERN, K. W., MOFFORD, K. A., SEDDON, T., HUANG, L., SORGI, F., THOMSON, A., MACVINISH, L. J., RATCLIFF, R., BILTON, D., LANE, D. J., LITTLEWOOD, J. M., WEBB, A. K., MIDDLETON, P. G., COLLEDGE, W. H., CUTHBERT, A. W., EVANS, M. J., HIGGINS, C. F., HYDE, S. C. (1997). A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. Gene Ther., 4, 199-209.

GRILLONE, L. R., LANZ, R. (2001). Fomivirsen. Drugs Today (Barc.), 37, 245-255.

GUO, W., LEE, R. J. (2001). Efficient gene delivery via non-covalent complexes of folic acid and polyethylenimine. J. Control Release, 77, 131-138.

HEBERT, E. (2003). Improvement of exogenous DNA nuclear importation by nuclear localization signal-bearing vectors: a promising way for non-viral gene therapy? Biol. Cell, 95, 59-68.

HEJAZI, R., AMIJI, M. (2003). Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. J. Control Release, 89, 151-165.

HOROWITZ, J. (1999). Adenovirus-mediated p53 gene therapy: overview of preclinical studies and potential clinical applications. Curr. Opin. Mol. Ther., 1, 500-509.

ILLUM, L., JABBAL-GILL, I., HINCHCLIFFE, M., FISHER, A. N., DAVIS, S. S. (2001). Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. Adv. Drug Deliv. Rev., 51, 81-96.

ISHII, T., OKAHATA, Y., SATO, T. (2001). Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. Biochim. Biophys. Acta, 1514, 51-64.

ISOBE, H., SUGIYAMA, S., FUKUI, K. K., IWASAWA, Y., NAKAMURA, E. (2001). Atomic Force Microscope Studies on Condensation of Plasmid DNA with Functionalized Fullerenes This research was supported by Grant-in-Aid for Specially Promoted Research from Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology. Angew. Chem. Int. Ed Engl., 40, 3364-3367.

KICHLER, A., LEBORGNE, C., COEYTAUX, E., DANOS, O. (2001). Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. J. Gene Med., 3, 135-144.

KIM, Y. H., GIHM, S. H., PARK, C. R., LEE, K. Y., KIM, T. W., KWON, I. C., CHUNG, H., AND JEONG, S. Y. (2001). Structural characteristics of size-controlled

self-aggregates of deoxycholic acid-modified chitosan and their application as a DNA delivery carrier. Bioconjug. Chem., 12, 932-938.

KUMAR, M., BEHERA, A. K., LOCKEY, R. F., ZHANG, J., BHULLAR, G., DE LA CRUZ, C. P., CHEN, L. C., LEONG, K. W., HUANG, S. K., MOHAPATRA, S. S. (2002). Intranasal gene transfer by chitosan-DNA nanospheres protects BALB/c mice against acute respiratory syncytial virus infection. Hum. Gene Ther., 13, 1415-1425.

KUO, P. Y., SALTZMAN, W. M. (1996). Novel systems for controlled delivery of macromolecules. Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr., 6, 59-73.

LAITINEN, M., HARTIKAINEN, J., HILTUNEN, M. O., ERANEN, J., KIVINIEMI, M., NARVANEN, O., MAKINEN, K., MANNINEN, H., SYVANNE, M., MARTIN, J. F., LAAKSO, M., YLA-HERTTUALA, S. (2000). Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. Hum. Gene Ther., 11, 263-270.

LEAMON, C. P., LOW, P. S. (1991). Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 88, 5572-5576.

LEE, K. Y., KWON, I. C., KIM, Y. H., JO, W. H., JEONG, S. Y. (1998). Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system. J. Control Release, 51, 213-220.

LEE, R. J., LOW, P. S. (1994). Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. J. Biol. Chem., 269, 3198-3204.

LEONG, K. W., MAO, H. Q., TRUONG-LE, V. L., ROY, K., WALSH, S. M., AUGUST, J. T. (1998). DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. J. Control Release, 53, 183-193.

LIU, F., HUANG, L. (2002). Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. J. Control Release, 78, 259-266.

LU, Y., LOW, P. S. (2002). Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. Adv. Drug Deliv. Rev., 54, 675-693.

LUCOCK, M. (2000). Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. Mol. Genet. Metab, 71, 121-138.

LUCOCK, M., DASKALAKIS, I. (2000). New perspectives on folate status: a differential role for the vitamin in cardiovascular disease, birth defects and other conditions. Br. J. Biomed. Sci., 57, 254-260.

LUCOCK, M., DASKALAKIS, I., BRIGGS, D., YATES, Z., LEVENE, M. (2000). Altered folate metabolism and disposition in mothers affected by a spina bifida pregnancy: influence of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase genotypes. Mol. Genet. Metab, 70, 27-44.

LUKACS, G. L., HAGGIE, P., SEKSEK, O., LECHARDEUR, D., FREEDMAN, N., VERKMAN, A. S. (2000). Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. J. Biol. Chem., 275, 1625-1629.

MACLAUGHLIN, F. C., MUMPER, R. J., WANG, J., TAGLIAFERRI, J. M., GILL, I., HINCHCLIFFE, M., ROLLAND, A. P. (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. J. Control Release, 56, 259-272.

MANSOURI, S., LAVIGNE, P., CORSI, K., BENDERDOUR, M., BEAUMONT, E., FERNANDES, J. C. (2004). Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. Eur. J. Pharm. Biopharm., 57, 1-8.

MAO, H. Q., ROY, K., TROUNG-LE, V. L., JANES, K. A., LIN, K. Y., WANG, Y., AUGUST, J. T., LEONG, K. W. (2001b). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. J. Control Release, 70, 399-421.

MERDAN, T., KUNATH, K., FISCHER, D., KOPECEK, J., KISSEL, T. (2002). Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. Pharm. Res., 19, 140-146.

MUMPER, R. J., DUGUID, J. G., ANWER, K., BARRON, M. K., NITTA, H., ROLLAND, A. P. (1996). Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. Pharm. Res., 13, 701-709.

NAKASHIMA-MATSUSHITA, N., HOMMA, T., YU, S., MATSUDA, T., SUNAHARA, N., NAKAMURA, T., TSUKANO, M., RATNAM, M., MATSUYAMA, T. (1999). Selective expression of folate receptor beta and its possible role in

methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum., 42, 1609-1616.

OKAMOTO, H., NISHIDA, S., TODO, H., SAKAKURA, Y., IIDA, K., DANJO, K. (2003). Pulmonary gene delivery by chitosan-pDNA complex powder prepared by a supercritical carbon dioxide process. J. Pharm. Sci., 92, 371-380.

OLIGINO, T. J., YAO, Q., GHIVIZZANI, S. C., ROBBINS, P. (2000). Vector systems for gene transfer to joints. Clin. Orthop., 379 Suppl, S17-S30.

OUPICKY, D., HOWARD, K. A., KONAK, C., DASH, P. R., ULBRICH, K., SEYMOUR, L. W. (2000). Steric stabilization of poly-L-Lysine/DNA complexes by the covalent attachment of semitelechelic poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]. Bioconjug. Chem., 11, 492-501.

OZBAS-TURAN, S., ARAL, C., KABASAKAL, L., KEYER-UYSAL, M., AKBUGA, J. (2003). Co-encapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a non-viral gene delivery vehicle. J. Pharm. Pharm. Sci., 6, 27-32.

PAN, X. Q., ZHENG, X., SHI, G., WANG, H., RATNAM, M., LEE, R. J. (2002). Strategy for the treatment of acute myelogenous leukemia based on folate receptor beta-targeted liposomal doxorubicin combined with receptor induction using all-trans retinoic acid. Blood, 100, 594-602.

PARK, I. K., KIM, T. H., PARK, Y. H., SHIN, B. A., CHOI, E. S., CHOWDHURY, E. H., AKAIKE, T., CHO, C. S. (2001). Galactosylated chitosan-graft-poly(ethylene glycol) as hepatocyte-targeting DNA carrier. J. Control Release, 76, 349-362.

PAULOS, C. M., TURK, M. J., BREUR, G. J., LOW, P. S. (2004). Folate receptor-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to activated macrophages in rheumatoid arthritis. Adv. Drug Deliv. Rev., 56, 1205-1217.

PORTEOUS, D. J., DORIN, J. R., MCLACHLAN, G., VIDSON-SMITH, H., DAVIDSON, H., STEVENSON, B. J., CAROTHERS, A. D., WALLACE, W. A., MORALEE, S., HOENES, C., KALLMEYER, G., MICHAELIS, U., NAUJOKS, K., HO, L. P., SAMWAYS, J. M., IMRIE, M., GREENING, A. P., INNES, J. A. (1997). Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. Gene Ther., 4, 210-218.

POUTON, C. W., SEYMOUR, L. W. (2001b). Key issues in non-viral gene delivery. Adv. Drug Deliv. Rev., 46, 187-203..

QUONG, D., NEUFELD, R. J. (1998). DNA protection from extracapsular nucleases, within chitosan- or poly-L-lysine-coated alginate beads. Biotechnol. Bioeng., 60, 124-134.

RAO, S. B., SHARMA, C. P. (1997). Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. J. Biomed. Mater. Res., 34, 21-28.

REDDY, J. A., ABBURI, C., HOFLAND, H., HOWARD, S. J., VLAHOV, I., WILS, P., LEAMON, C. P. (2002). Folate-targeted, cationic liposome-mediated gene transfer into disseminated peritoneal tumors. Gene Ther., 9, 1542-1550.

RICHARDSON, S. C., KOLBE, H. V., DUNCAN, R. (1999). Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. Int. J. Pharm., 178, 231-243.

RITTNER, K., BENAVENTE, A., BOMPARD-SORLET, A., HEITZ, F., DIVITA, G., BRASSEUR, R., JACOBS, E. (2002). New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. Mol. Ther., 5, 104-114.

ROMOREN, K., THU, B. J., EVENSEN, O. (2002). Immersion delivery of plasmid DNA. II. A study of the potentials of a chitosan based delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. J. Control Release, 85, 215-225.

SATO, T., ISHII, T., OKAHATA, Y. (2001). In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. Biomaterials, 22, 2075-2080.

SHEID, B. (1992). Angiogenic effects of macrophages isolated from ascitic fluid aspirated from women with advanced ovarian cancer. Cancer Lett., 62, 153-158.

SHI, G., GUO, W., STEPHENSON, S. M., LEE, R. J. (2002). Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic/anionic lipid combinations. J. Control Release, 80, 309-319.

SOMIA, N., VERMA, I. M. (2000). Gene therapy: trials and tribulations. Nat. Rev. Genet., 1, 91-99.

SONG, Y. K., LIU, D. (1998). Free liposomes enhance the transfection activity of DNA/lipid complexes in vivo by intravenous administration. Biochim. Biophys. Acta, 1372, 141-150.

SUDIMACK, J., LEE, R. J. (2000). Targeted drug delivery via the folate receptor. Adv. Drug Deliv. Rev., 41, 147-162.

THANOU, M., FLOREA, B. I., GELDOF, M., JUNGINGER, H. E., AND BORCHARD, G. (2002). Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines. Biomaterials, 23, 153-159.

TRUONG-LE, V. L., WALSH, S. M., SCHWEIBERT, E., MAO, H. Q., GUGGINO, W. B., AUGUST, J. T., LEONG, K. W. (1999). Gene transfer by DNA-gelatin nanospheres. Arch. Biochem. Biophys., 361, 47-56.

TURK, M. J., BREUR, G. J., WIDMER, W. R., PAULO, C. M., XU, L. C., GROTE, L. A., LOW, P. S. (2002). Folate-targeted imaging of activated macrophages in rats with adjuvant-induced arthritis. Arthritis Rheum., 46, 1947-1955.

TURK, M. J., WATERS, D. J., LOW, P. S. (2004). Folate-conjugated liposomes preferentially target macrophages associated with ovarian carcinoma. Cancer Lett., 213, 165-172.

WANG, S., LUO, J., LANTRIP, D. A., WATERS, D. J., MATHIAS, C. J., GREEN, M. A., FUCHS, P. L., LOW, P. S. (1997). Design and synthesis of [¹¹¹In]DTPA-folate for use as a tumor-targeted radiopharmaceutical. Bioconjug. Chem., **8**, 673-679.

WHEELER, J. J., PALMER, L., OSSANLOU, M., MACLACHLAN, I., GRAHAM, R. W., ZHANG, Y. P., HOPE, M. J., SCHERRER, P., CULLIS, P. R. (1999). Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization. Gene Ther., **6**, 271-281.

WOLFERT, M. A., SEYMOUR, L. W. (1996). Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA. Gene Ther., **3**, 269-273.

WOLFF, J. A., MALONE, R. W., WILLIAMS, P., CHONG, W., ACSADI, G., JANI, A., FELGNER, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science, **247**, 1465-1468.

ZABNER, J., FASBENDER, A. J., MONINGER, T., POELLINGER, K. A., WELSH, M. J. (1995). Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. J. Biol. Chem., **270**, 18997-19007.

ZAVADOVA, E., LOERCHER, A., VERSTOVSEK, S., VERSCHRAEGEN, C. F., MICKSCHE, M., REEDMAN, R. S. (1999). The role of macrophages in antitumor defense of patients with ovarian cancer. Hematol. Oncol. Clin. North Am., **13**, 135-44.

ZELPHATI, O., WANG, Y., KITADA, S., REED, J. C., FELGNER, P. L., CORBEIL, J. (2001). Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system. J. Biol. Chem., 276, 35103-35110.