

2 M 11.2667.3

Université de Montréal

Influence du chauffage et de l'environnement biologique
sur la stabilité des porteurs liposomaux d'ADN

par

Sophie Khalifé

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M. Sc)
en sciences pharmaceutiques

Décembre 1998

© Sophie Khalifé, 1998



2.5000000

QU
705
U58
1999
V.001

Université de Montréal

Influence du chauffage et de l'environnement biologique
sur la stabilité des gènes liposomaux d'ADN

par
Sophie Stiehl

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en pharmacie (M. Pharm.)
en chimie pharmaceutique

Décembre 1999

1999

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Influence du chauffage et de l'environnement biologique
sur la stabilité des porteurs liposomaux d'ADN

présenté par:

Sophie Khalifé

a été évalué par un jury constitué des personnes suivantes:

Jean-Christophe Leroux:

Président du jury

Nigel C. Phillips:

Directeur de recherche

Patrice Hildgen:

Membre du jury

Mémoire accepté le:

15.12.1998

SOMMAIRE

En vue d'améliorer l'incorporation des acides nucléiques (ADN génomique de sperme de saumon, ARN de levure et plasmide pBR322) dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP (1,2-dioléoylphosphatidyléthanolamine, 1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium propane), l'influence du chauffage sur les porteurs liposomaux d'acides nucléiques a été déterminée par analyse spectrofluorimétrique avec le bromure d'éthidium (BrEt) et l'orange d'acridine.

La petite taille du plasmide pBR322 de forme circulaire et sa structure plus compacte, facilitent considérablement son incorporation dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP, comparée à celle obtenue avec l'ADN génomique de sperme de saumon ou avec l'ARN de levure. La linéarisation du plasmide pBR322 améliore significativement son incorporation dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP. Le plasmide pBR322 linéarisé s'insère plus aisément entre les chaînes du poly(éthylène) glycol (PEG), insérées à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP. L'effet de "barrière stérique" des dérivés de distéaroylphosphatidyléthanolamine PEG (DSPE-PEG) à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, s'atténue à mesure qu'on élève la température de chauffage.

Le plasmide pBR322 libre ou incorporé dans les liposomes DOPE:DOTAP présente une activité au sein des bactéries *E. coli*. Les complexes pBR322-DOPE:DOTAP confèrent aux bactéries *E. coli* l'expression d'une résistance à l'ampicilline et à la tétracycline, nettement supérieure à celle obtenue avec le plasmide libre précipité au chlorure de calcium et introduit par choc de chaleur dans les bactéries *E. coli*.

L'élévation de la température de chauffage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP est accompagnée par une diminution de l'expression du plasmide pSV- β -Gal dans les cellules de mammifères Cos-7, à cause notamment de la dénaturation du plasmide pSV- β -Gal. Néanmoins, l'incorporation du plasmide pSV- β -Gal dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non, protège davantage l'ADN contre sa dégradation par les nucléases intracellulaires ou extracellulaires et assure des activités de transfection du plasmide pSV- β -Gal dans les cellules Cos-7, jusqu'à 10 fois plus élevées que celles obtenues lors de la précipitation du plasmide pSV- β -Gal au phosphate de calcium. L'efficacité de transfection du plasmide pSV- β -Gal dans les cellules Cos-7, est largement dépendante de la concentration du plasmide pSV- β -Gal et des lipides cationiques DOTAP, de la composition du milieu de pré-incubation (absence

ou non de sérum), ainsi que du temps de pré-incubation des complexes dans le milieu de culture des cellules Cos-7.

La stabilité des porteurs liposomaux d'ADN en présence de 10% de sérum de veau, de déoxycholate de sodium (SDS), de lipoprotéines du plasma sanguin humain HDL, LDL et VLDL et des composants du milieu synovial, a été évaluée par spectroscopie de corrélation de photons, en mesurant les changements de diamètre (agrégation) des liposomes cationiques DOPE:DOTAP. Le potentiel zêta (ζ) liposomal et la rétention de l'ADN plasmidique au sein des liposomes cationiques DOPE:DOTAP ont été déterminés respectivement, par dispersion électrophorétique de Doppler et par analyse spectrofluorimétrique avec le BrEt.

Les liposomes cationiques DOPE:DOTAP s'agrègent fortement et subissent une diminution significative de leur potentiel ζ en présence de 10% de sérum de veau, de SDS, de lipoprotéines du plasma sanguin humain et des composants du milieu synovial. Malgré une protection accrue des liposomes DOPE:DOTAP-DSPE-PEG₅₀₀₀ vis-à-vis des effets déstabilisants de l'acide hyaluronique (AH) et du sulfate de chondroïtine A (CSA), le DSPE-PEG₅₀₀₀ n'inhibe pas la capacité de molécules linéaires et anioniques comme AH, de s'insérer entre les chaînes de PEG et d'induire la libération de l'ADN liposomal.

Des études en résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ¹H) ont suggéré une saturation très rapide des sites d'insertion des dérivés de DSPE-PEG à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP. La présence de dérivés de DSPE-PEG incorporés à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, confère une plus grande protection aux liposomes DOPE:DOTAP vis-à-vis de leur déstabilisation par les constituants biologiques étudiés, et améliore grandement leur durée d'entreposage à de basses températures (-20°C et 4°C). Cependant, la couche hydrophile de PEG à la surface de ces liposomes constitue une "barrière stérique" qui limite la quantité d'ADN pouvant être incorporée dans les liposomes cationiques. Le PEG interfère probablement en partie, avec la capacité des complexes ADN-DOPE:DOTAP d'interagir avec les membranes cellulaires et d'assurer le transport et l'expression efficaces de l'ADN dans le noyau.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
1. INTRODUCTION	1
1.1. LIPOSOMES.....	2
1.1.1. Composantes biochimiques des liposomes.....	2
1.1.2. Classification des liposomes.....	4
1.1.3. Fonctions multiples des liposomes.....	4
1.2. PROBLÈMES POSÉS PAR L'UTILISATION DES LIPOSOMES COMME VECTEURS DE SUBSTANCES MÉDICAMENTEUSES.....	5
1.2.1. Stabilité des liposomes.....	6
1.2.2. Stabilité des liposomes dans les liquides biologiques.....	7
1.2.2.1. Stabilité des liposomes en présence de sérum.....	8
1.2.2.2. Stabilité des liposomes en présence des lipoprotéines humaines.....	8
1.2.3. Principaux problèmes posés par l'étude pharmacocinétique des liposomes et des substances actives qu'ils contiennent.....	8
1.2.4. Problèmes technologiques posés par l'utilisation des liposomes comme vecteurs de substances médicamenteuses.....	9
1.2.4.1. Conditions de fabrication.....	9
1.2.4.2. Conservation des liposomes.....	10
1.3. EFFET DU POLY(ÉTHYLÈNE) GLYCOL (PEG) SUR LES LIPOSOMES.....	10
1.4. APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES.....	12
1.4.1. Thérapie antitumorale.....	12
1.4.2. Traitement de la polyarthrite rhumatoïde.....	13
1.4.3. Utilisation des liposomes comme adjuvants d'immunisation.....	14
1.4.3.1. Vaccins liposomaux.....	14
1.5. UTILISATION DES LIPOSOMES POUR LE TRANSFERT ET L'EXPRESSION DES GÈNES.....	14
1.5.1. Vecteurs viraux et non-viraux de gènes.....	16
1.5.2. Systèmes non-viraux de livraison de gènes.....	18
1.5.2.1. Méthodes physiques de livraison des gènes.....	19
1.5.2.1.1. Transfection.....	19
1.5.2.1.2. Micro-injection de l'ADN.....	19
1.5.2.1.3. Bombardement de l'ADN avec des microparticules.....	19
1.5.2.1.4. Électroporation.....	20
1.5.2.1.5. Lipides cationiques et liposomes.....	20
1.6. LE TRANSFERT DE L'ADN À TRAVERS LA MEMBRANE CELLULAIRE JUSQU' AU NOYAU.....	25
1.6.1. Libération efficace de l'ADN des endosomes.....	25
1.6.1.1. Les adénovirus.....	26
1.6.1.2. Les "Cytofectins".....	26
1.6.1.3. Les immunoliposomes sensibles au pH.....	27
1.6.2. Protection des porteurs liposomaux d'ADN.....	27
1.7. OBJECTIFS DU PROJET.....	29
2. PARTIE EXPÉRIMENTALE	31
2.1. PRODUITS.....	32
2.2. MÉTHODOLOGIE.....	35
2.2.1. Étude préliminaire des interactions ADN-liposomes cationiques.....	35
2.2.1.1. Préparation des liposomes.....	35
2.2.1.2. Interactions ADN-liposomes cationiques.....	35
2.2.2. Influence du chauffage sur l'incorporation des acides nucléiques dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP (méthode directe).....	36

2.2.2.1. Linéarisation, purification et intégrité du plasmide pBR322.....	37
2.2.3. Effets des variations de température sur l'incorporation du plasmide pBR322 dans les liposomes cationiques (méthode indirecte).....	38
2.2.4. Effet du chauffage sur l'expression de l'ADN liposomal dans les bactéries <i>E. coli</i>	39
2.2.4.1. Courbe de croissance des bactéries <i>E. coli</i>	39
2.2.4.2. Étude de la stabilité des liposomes cationiques dans le milieu de croissance des bactéries <i>E. coli</i>	40
2.2.4.3. Insertion du plasmide pBR322 ou des complexes pBR322-liposomes cationiques dans les bactéries <i>E. coli</i>	40
2.2.5. Transfection du plasmide pSV- β -Gal dans les cellules Cos-7 (influence des conditions expérimentales).....	41
2.2.5.1. Courbes de dosage du plasmide pSV- β -Gal.....	41
2.2.5.2. Influence de l'insertion du DSPE-PEG ₅₀₀₀ à la surface des liposomes DOPE:DOTAP sur les propriétés des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP.....	42
2.2.5.3. Culture cellulaire et transfections.....	43
2.2.5.4. Détection de l'activité de la β -Galactosidase.....	44
2.2.5.5. Toxicité des liposomes cationiques dans les cellules Cos-7.....	44
2.2.6. Effet de certains constituants biologiques sur la stabilité des liposomes cationiques.....	45
2.2.6.1. Sérum de veau.....	46
2.2.6.2. Spectroscopie en RMN ¹ H.....	46
2.2.6.3. Déoxycholate de sodium (SDS).....	47
2.2.6.4. Lipoprotéines humaines.....	48
3. RÉSULTATS.....	49
3.1. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DES INTERACTIONS ACIDES NUCLÉIQUES-LIPOSOMES CATIONIQUES.....	50
3.1.1. Caractérisation des liposomes cationiques DOPE:DOTAP.....	50
3.1.2. Fluorescence de l'ADN génomique liposomal.....	55
3.1.3. Effet de PEG à la surface des liposomes cationiques.....	56
3.2. INFLUENCE DU CHAUFFAGE SUR L'INCORPORATION DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS LES LIPOSOMES CATIONIQUES.....	56
3.2.1. Sensibilité du plasmide pBR322 à la digestion par la DNase I.....	59
3.2.2. Effets des variations de température sur l'incorporation du plasmide pBR322 dans les liposomes cationiques.....	60
3.2.3. Courbe de croissance des bactéries <i>E. coli</i>	62
3.2.3.1. Stabilité des liposomes cationiques dans le milieu de croissance des bactéries <i>E. coli</i>	63
3.2.3.2. Interactions entre les liposomes cationiques et les bactéries <i>E. coli</i>	64
3.2.3.3. Linéarisation, purification et intégrité du plasmide pBR322.....	65
3.2.4. Insertion du plasmide pBR322 ou des complexes pBR322-liposomes cationiques dans les bactéries <i>E. coli</i>	67
3.2.4.1. Effet du chauffage sur l'expression du pBR322 libre ou liposomal au sein des bactéries <i>E. coli</i>	69
3.2.5. Transfection du plasmide pSV- β -Gal dans les cellules Cos-7 (influence des conditions expérimentales).....	73
3.2.5.1. Précipitation au phosphate de calcium.....	73
3.2.5.2. Influence de l'insertion du DSPE-PEG ₅₀₀₀ à la surface des liposomes DOPE:DOTAP sur les propriétés des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP.....	74
3.2.5.3. Transfections.....	76
3.3. EFFET DE CERTAINS CONSTITUANTS BIOLOGIQUES SUR LA STABILITÉ DES LIPOSOMES CATIONIQUES.....	83
3.3.1. Sérum de veau.....	83
3.3.2. Déoxycholate de sodium (SDS).....	90
3.3.3. Lipoprotéines humaines.....	92
4. DISCUSSION.....	100
4.1. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DES INTERACTIONS ACIDES NUCLÉIQUES-LIPOSOMES CATIONIQUES.....	101
4.1.1. Caractérisation des complexes ADN:DOPE:DOTAP.....	101
4.1.2. Incorporation des dérivés de PEG (RMN ¹ H).....	102
4.1.3. Effet de la concentration des liposomes cationiques sur l'incorporation des acides nucléiques dans ces liposomes.....	102

4.2. INFLUENCE DU CHAUFFAGE SUR L'INCORPORATION DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS LES LIPOSOMES CATIONIQUES DOPE:DOTAP.....	104
4.2.1. Effet de l'élévation de la température de chauffage sur l'incorporation des acides nucléiques dans les liposomes cationiques.....	104
4.2.2. Influence du matériel génétique sur l'incorporation des acides nucléiques dans les liposomes cationiques.....	105
4.2.2.1. Influence des dérivés de PEG sur l'incorporation de l'ADN dans les liposomes cationiques.....	106
4.3. EFFET DU CHAUFFAGE SUR L'EXPRESSION DE L'ADN LIPOSOMAL DANS LES BACTÉRIES E. COLI ...	107
4.3.1. Insertion du plasmide pBR322 précipité au chlorure de calcium ou des complexes pBR322-DOPE:DOTAP dans les bactéries E. coli	107
4.4. EFFET DU CHAUFFAGE SUR L'EXPRESSION DE L'ADN LIPOSOMAL DANS LES CELLULES COS-7.....	109
4.4.1. Transfection du plasmide pSV- β -Gal libre ou liposomal dans les cellules Cos-7	109
4.4.2. Influence des conditions expérimentales	111
4.5. INFLUENCE DE CERTAINS CONSTITUANTS DE L'ENVIRONNEMENT BIOLOGIQUES SUR LA STABILITÉ DES PORTEURS LIPOSOMAL D'ADN	112
4.5.1. Sérum de veau.....	112
4.5.2. Déoxycholate de sodium (SDS).....	115
4.5.3. Lipoprotéines humaines.....	116
5. CONCLUSIONS.....	119
REMERCIEMENTS.....	124
BIBLIOGRAPHIE.....	125
ANNEXE.....	133

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u>	
a. Spectre des liposomes DOPE:DOTAP obtenu en RMN ¹ H	51
b. Spectre des liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG ₂₀₀₀ obtenu en RMN ¹ H	52
<u>Figure 2</u>	
Courbes de calibration en RMN ¹ H des liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG ₂₀₀₀ et DOPE:DOTAP:DSPE-PEG ₅₀₀₀	53
<u>Figure 3</u>	
Quantités de PEG insérées à la surface des liposomes DOPE:DOTAP, déterminées par RMN ¹ H après incubation avec 10 mol%, 25 mol% ou 50 mol% de DSPE-PEG ₂₀₀₀ ou de DSPE- PEG ₅₀₀₀	53
<u>Figure 4</u>	
Effets des dérivés du poly(éthylène) glycol (PEG) sur l'incorporation de l'ADN génomique de sperme de saumon dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP	55
<u>Figure 5</u>	
Courbes de calibration de l'ADN génomique de sperme de saumon et de l'ARN de levure	56
<u>Figure 6</u>	
Influence du chauffage sur l'incorporation de l'ADN génomique de sperme de saumon dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non	57
<u>Figure 7</u>	
Effet du chauffage sur l'incorporation de l'ARN de levure dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non.	58
<u>Figure 8</u>	
Influence du chauffage sur l'incorporation du plasmide pBR322 dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non.	58
<u>Figure 9</u>	
Susceptibilité du plasmide pBR322 à la digestion par la déoxyribonucléase (DNase I).....	59
<u>Figure 10</u>	
Influence de l'élévation de la température de chauffage sur l'incorporation du plasmide pBR322 dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non.	60
<u>Figure 11</u>	
Effet de l'élévation de la température de chauffage sur l'incorporation du plasmide pBR322 linéarisé dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non.	61
<u>Figure 12</u>	
Courbe de croissance des bactéries <i>E. coli</i> et résistance à des antibiotiques ampicilline et tétracycline	62

Figure 13	Effet des liposomes cationiques DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, sur la croissance des bactéries <i>E. coli</i>	64
Figure 14	Électrophorèse sur gel d’agarose du plasmide pBR322 circulaire ou linéarisé, incorporé par chauffage à 85°C dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP.	65
Figure 15	Électrophorèse sur gel d’agarose du plasmide pBR322 circulaire ou linéarisé, incorporé par chauffage à 70°C ou à 85°C, dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP.	65
Figure 16	Effet du chauffage à 85°C des complexes pBR322-DOPE:DOTAP, sur la résistance des bactéries <i>E. coli</i> à l’ampicilline.	68
Figure 17	Effet du chauffage à 85°C du plasmide pBR322 libre ou des complexes pBR322-DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, sur la résistance des bactéries <i>E. coli</i> à l’ampicilline.....	69
Figure 18	Effet du plasmide pBR322, des complexes pBR322-DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, formés à 23°C, sur la résistance des bactéries <i>E. coli</i> à l’ampicilline.....	70
Figure 19	Influence du chauffage à 85 °C du plasmide pBR322 libre linéarisé, ou des complexes pBR322 linéarisé-DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, sur la résistance des bactéries <i>E. coli</i> à l’ampicilline. ..	71
Figure 20	Effet du plasmide pBR322 linéarisé, des complexes pBR322-DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, formés à 23°C, sur la résistance des bactéries <i>E. coli</i> à l’ampicilline.	72
Figure 21	Effet du chauffage sur l’expression du plasmide pSV-β-Gal précipité au phosphate de calcium dans les cellules de mammifère Cos-7.	73
Figure 22	Influence de la concentration de plasmide pSV-β-Gal précipité au phosphate de calcium, sur l’expression de la β-Galactosidase dans les cellules Cos-7.	76
Figure 23	Cytotoxicité du plasmide pSV-β-Gal précipité au phosphate de calcium, déterminée par le test colorimétrique basé sur la libération de la LDH	77
Figure 24	Influence du temps de pré-incubation de 5 µg de plasmide pSV-β-Gal avec 50 µg de liposomes cationiques DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, sur l’expression de la β-Galactosidase dans les cellules Cos-7.....	78
Figure 25	Effet du temps de pré-incubation des complexes pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP dans les cellules Cos-7, sur l’expression de la β-Galactosidase.....	79

Figure 26	Influence du temps de pré-incubation des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG ₂₀₀₀ , dans les cellules Cos-7, sur l'expression de la β -Galactosidase.....	79
Figure 27	Toxicité des liposomes cationiques après 24 heures d'incubation des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP dans le DMEM des cellules Cos-7.	81
Figure 28	Toxicité des liposomes cationiques incubés 24 heures dans le DMEM-FCS dans les cellules Cos-7.	82
Figure 29	Séparation par chromatographie d'exclusion stérique des liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG ₂₀₀₀ ou DOPE:DOTAP:DSPE-PEG ₅₀₀₀ de leurs micelles de DSPE-PEG	83
Figure 30	Influence de la température d'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP et des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP auxquels ont été incorporés initialement 10 mol%, 25 mol% ou 50 mol% de DSPE-PEG ₂₀₀₀ sur le diamètre.....	85
Figure 31	Influence de la température d'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP et des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP auxquels ont été ajoutés initialement 10 mol%, 25 mol% ou 50 mol% de DSPE-PEG ₂₀₀₀ sur le potentiel ζ	86
Figure 32	Influence de la température d'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP et des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP auxquels ont été incorporés initialement 10 mol%, 25 mol% ou 50 mol% de DSPE-PEG ₅₀₀₀ sur le diamètre.....	86
Figure 33	Influence de la température d'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP auxquels ont été incorporés initialement 10 mol%, 25 mol% ou 50 mol% de DSPE-PEG ₅₀₀₀ sur le potentiel ζ	87
Figure 34	Influence de différentes températures d'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP sur l'expression de la β -Galactosidase	88
Figure 35	Influence de la température et de la durée d'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP-DSPE:PEG ₅₀₀₀ sur l'expression de la β -Galactosidase.....	89
Figure 36	Effet de 10 mM de SDS, sur la rétention du plasmide pSV- β -Gal dans les liposomes DOPE:DOTAP, auxquels ont été greffés initialement 10 mol%, 25 mol%, ou 50 mol% de DSPE-PEG ₂₀₀₀	90

<u>Figure 37</u>	
Effet de 10 mM de SDS, sur la rétention du plasmide pSV- β -Gal dans les liposomes DOPE:DOTAP, auxquels ont été greffés initialement 10 mol%, 25 mol%, ou 50 mol% de DSPE-PEG ₅₀₀₀	91
<u>Figure 38</u>	
Effet des lipoprotéines humaines HDL, LDL ou VLDL sur les diamètres (agrégation) des liposomes cationiques DOPE:DOTAP et des liposomes anioniques DOPE:DMPG.....	93
<u>Figure 39</u>	
Potentiel ζ des liposomes cationiques et anioniques incubés à 37°C, en présence des lipoprotéines humaines HDL, LDL ou VLDL.....	94
<u>Figure 40</u>	
Influence des lipoprotéines humaines HDL, LDL ou VLDL sur les diamètres (agrégation) des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP et pSV- β -Gal-DOPE:DMPG.....	95
<u>Figure 41</u>	
Influence des lipoprotéines humaines HDL, LDL ou VLDL sur les potentiels ζ des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP ou pSV- β -Gal-DOPE:DMPG.....	96
<u>Figure 42</u>	
Courbes de calibration de l'influence des lipoprotéines humaines HDL, LDL ou VLDL sur la fluorescence du plasmide pSV- β -Gal.....	97
<u>Figure 43</u>	
Influence des lipoprotéines humaines HDL, LDL ou VLDL sur la rétention du plasmide pSV- β -Gal incorporé dans les liposomes cationiques ou anioniques.....	98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1

Cibles pour le transfert *in vivo* de gènes par les méthodes non-virales 18

Tableau 2

Interaction à 23°C des liposomes cationiques DOPE:DOTAP avec l'ADN génomique de sperme de saumon. 50

Tableau 3

Stabilité des liposomes cationiques DOPE:DOTAP en présence du milieu de culture LB des bactéries *E. coli*. 63

Tableau 4

Effet du plasmide pBR322 de forme circulaire ou linéarisée sur la croissance des bactéries *E. coli* et résistance à l'ampicilline et à la tétracycline 67

Tableau 5

Effet de l'insertion du DSPE-PEG₂₀₀₀ à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP sur l'incorporation du plasmide pSV-β-Gal dans les liposomes DOPE:DOTAP..... 74

Tableau 6

Effet de l'insertion du DSPE-PEG₂₀₀₀ à la surface des complexes pSV-40-β-Gal-DOPE:DOTAP sur leurs diamètres et potentiels ζ 75

Tableau 7

Influence du sérum de veau sur les propriétés physico-chimiques des liposomes cationiques DOPE:DOTAP et de leurs formes "pegylées" 84

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
ARN	Acide ribonucléique
AZT	Azidothimidine

B

Bam H1	<i>Bacillus amylifaciens H1</i>
β-Gal	β-Galactosidase
BrEt	Bromure d'éthidium

C

COX	Cyclo-oxygénase
CSA	Chondroïtin sulfate A

D

DC-CHOL	3β[N-(N',N'-diméthylaminoéthane) carbamoyl] de cholestérol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMEM-FCS	Dulbecco's modified eagle medium with 10% fetal calf serum
DMRIE	Bromure d'ammonium de dimyristyloxypropyle diméthylehydroxyéthyle
DNase I	Déoxyribonucléase I
DOGS	Diocadécyl amidoglycylspermine
DOPE	Dioléoylphosphatidyléthanolamine
DOTAP	Dioléyletriméthylammonium propane
DOTMA	Bromure de dioléoyloxypropyle triméthyle ammonium
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DSPE	Distéaroylphosphatidyléthanolamine

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylène diaminetétraacétique

G

GM1	Ganglioside de type 1
-----	-----------------------

H

HBSS	Hank's balanced salt solution
HDL	High density lipoprotein

I

IgG	Immunoglobuline de type G
IL-1	Interleukine-1
IL-2	Interleukine-2
IL-1Ra	Antagoniste du récepteur de IL-1

L

LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Low density lipoprotein
LUV	Large unilamellar vesicule

M

MLV	Multilamellar vesicule
-----	------------------------

N

ND	Non-déterminé
----	---------------

O

ONPG *Ortho*-nitrophényle- β -D-galactoside

P

pB paire de bases

TPS tampon phosphate salin

PC Phosphatidylcholine

PEG Poly(éthylène) glycol

PEG-PPO Poly(éthylène) glycol-polypropylène oxide

PG Prostaglandine

PL Phospholipide

PM Poids moléculaire

PS Phosphatidylsérine

PVP Poly(vinylpyrrolidone)

R

RMN ^1H Résonance magnétique nucléaire du proton

S

SDS Déoxycholate de sodium

SIDA Syndrome d'immunodéficience acquise

SRE Système réticulo-endothélial

SUV Small unilamellar vesicule

SV40 Virus simian no. 40

T

TM "Trademark" ou marque déposée

T_m Température membranaire de transition de phase

V

VIH Virus d'immunodéficience humaine

VLDL Very low density lipoprotein

XX-gal β -bromo-4-chloro-3-indoyl- β -galactopyranoside

1. INTRODUCTION

1.1. Liposomes

Au cours des trente dernières années, les liposomes ont été l'objet de plus de vingt mille articles scientifiques sur des sujets aussi différents que la thérapie génique ou la nutrition. Plusieurs centaines de publications traitent du mode de formation des liposomes, de leurs propriétés physico-chimiques et de leurs nombreuses applications [1].

En 1961, Alec D. Bangham de l'Institut de physiologie animale de Cambridge, produisit fortuitement les premiers liposomes, alors qu'il étudiait l'activité des phospholipides (PL). Lorsqu'il ajouta de l'eau dans un flacon contenant un film de PL, il constata que les molécules phospholipidiques se redisposaient et s'agrégeaient de façon particulière: elles formaient des systèmes membranaires clos, emprisonnant des molécules d'eau [2, 3]. Weissman, Chappell et Papahadjopoulos ont par la suite grandement contribué avec succès à l'exploitation et à l'acceptation du modèle liposomal proposé par Bangham [4-7].

1.1.1. Composantes biochimiques des liposomes

L'étymologie du mot "liposome" vient de deux racines grecques: la première se réfère aux corps gras (les lipides): l'autre à une structure (le soma) [8]. Les liposomes sont de petites vésicules creuses, sphériques, formées d'une ou de plusieurs bicouches phospholipidiques, à l'intérieur desquelles une partie du solvant, ayant servi à la suspension, est séquestrée [1, 2].

Les PL sont des molécules amphiphiles, constituées d'une zone polaire ou chargée à forte affinité pour l'eau, et d'une zone apolaire hydrophobe formée de chaînes aliphatiques. De cette particularité structurale, découle une propriété fondamentale: leur tendance à s'auto-associer pour former des édifices supramoléculaires [9]. Cette structuration spontanée en présence d'eau conduit, en général, à des bicouches dont les propriétés varient très largement avec le taux d'hydratation, le taux de cholestérol, le pH, ou la présence d'ions. De plus, les propriétés des bicouches phospholipidiques varient également avec la température membranaire de transition de phase des PL ou T_m

(température où on a 50% des PL en phase de gel cristalline et 50% des PL en phase de gel liquide) [10]. Puisque ces structures ne sont stabilisées que par des interactions faibles entre les différents constituants, elles sont donc labiles en fonction des contraintes; les molécules au sein de l'édifice garderont ainsi une liberté de mouvement très importante [11, 12]. Les PL manifestent en général, un double polymorphisme caractéristique: ce sont des composés lyotropes, qui présentent des changements de phase différents suivant les quantités d'eau, et des composés thermotropes qui subissent des transitions de phase distinctes, suite à des variations thermiques [12-16]. La structure (nature des acides gras et du groupe de tête) et la dynamique des PL (mouvements intramoléculaires et intermoléculaires), conditionnent à la fois les interactions des PL avec d'autres molécules comme les peptides, les protéines ou les médicaments, mais aussi la stabilité des systèmes plus complexes comme les liposomes, qui sont en général, des mélanges de molécules amphiphiles [17].

Les liposomes sont formés à partir de divers PL, et peuvent contenir du cholestérol. Le choix des PL pour la formation des liposomes demeure assez limité. Les phosphatidylcholines (PC) constituent une classe prépondérante de PL; elles peuvent représenter jusqu'à 60% des PL des membranes biologiques naturelles. Ce sont le plus souvent des PC naturelles (jaune d'œuf ou soya) ou synthétiques, tels que dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) ou distéaroylphosphatidylcholine (DSPC). La phosphatidyléthanolamine (PE) est dotée d'une plus petite tête polaire que la PC. De ce fait, la présence d'atomes d'hydrogène directement attachés à l'azote de la fonction éthanolamine, facilite davantage les interactions avec d'autres molécules adjacentes, présentent dans les membranes phospholipidiques. Le phosphatidylglycérol (PG) possède en permanence une charge négative à pH physiologique. Ce dernier peut être isolé directement de sources naturelles, ou préparé semi-synthétiquement avec d'autres lipides, par l'action de la phospholipase D en présence de glycérol [17, 18].

L'adjonction du cholestérol entraîne un accroissement de l'empilement de la paroi liposomique lorsque celle-ci est formée de bicouches phospholipidiques de type fluide. Cependant, l'effet du cholestérol est différent quand les bicouches sont de type solide. Il tend alors à accroître la fluidité et la perméabilité de la paroi des liposomes [18] .

1.1.2. Classification des liposomes

Il est possible de classifier les liposomes selon leur taille et le nombre de bicouches phospholipidiques qu'ils comportent. On retrouve d'abord les liposomes unilamellaires, qui sont constitués d'une seule bicouche phospholipidique. Dans cette catégorie, on distingue les petites et grosses vésicules, soient les petites vésicules unilamellaires (SUV), ayant une taille variant entre 0.08-0.12 μm , et les grosses vésicules unilamellaires (LUV), de dimension située entre 0.5-2 μm . La seconde classe de liposomes renferme les vésicules multilamellaires (MLV), constituées de plusieurs bicouches concentriques, ressemblant étrangement à une pelure d'oignon [19]. Les MLV ont des tailles variant le plus souvent entre 0.2-0.5 μm et s'avèrent plus efficaces que les liposomes unilamellaires pour incorporer des médicaments liposolubles.

1.1.3. Fonctions multiples des liposomes

Les inconvénients des formes pharmaceutiques conventionnelles ont été clairement mis en évidence à la suite de l'attention prêtée aux problèmes de biodisponibilité, de pharmacovigilance ou encore d'observance [20, 21].

Une approche est orientée vers la recherche des formes capables de convoier la substance active jusqu'à la cellule ciblée et d'accroître ainsi sa spécificité en réduisant les effets indésirables. Parmi les nombreux vecteurs intracellulaires de médicaments proposés au cours des dernières années, on retrouve notamment, certaines macromolécules et enveloppes cellulaires [22], des vésicules ou des particules synthétiques telles que les liposomes [23, 24], les nanosphères et les microagrégats de protéines [25, 26].

Au début des années 1970, Gregoriadis a démontré que la séquestration de solutés dans les liposomes, constituait une des propriétés importantes pour le développement des liposomes en tant que transporteurs d'enzymes, de médicaments anticancéreux ou antimicrobiens [27, 28]. Au cours des vingt dernières années, la possibilité d'utiliser les liposomes comme vecteurs de médicaments n'a cessé d'être évoquée comme base pour de nouvelles thérapies [29-31]. Les objectifs principaux sont de concevoir des vecteurs ayant la capacité de modifier la distribution du principe actif, de façon à empêcher sa dégradation et sa dilution par l'organisme. On vise également, par l'entremise de ces vecteurs, à minimiser les effets toxiques de certains médicaments, et à modifier leur métabolisme et leur élimination [32]. À cela, vient s'ajouter l'utilisation potentielle des liposomes comme stimulants des moyens de défense de l'organisme (effet immunoadjuvant) [33]. Les liposomes ont ainsi été choisis par de nombreux chercheurs comme véhicules pour la livraison et le ciblage de médicaments [34-36] et de vaccins [37].

Les liposomes manifestent aussi des caractéristiques biologiques incluant leur biocompatibilité, leur biodégradabilité et leur capacité d'interagir avec les membranes biologiques et les cellules [31]. À cause de leur caractère amphiphile, les liposomes s'avèrent de puissants systèmes de solubilisation et de dispersion d'une grande variété de composés. Ils assurent également le transport de composés lipophiles, capables de se dissoudre dans leur membrane phospholipidique, voire même se complexer ou s'insérer dans leur bicouche [38, 39]. Les liposomes occupent une place de choix en tant que transporteurs de différents composés en biochimie analytique, en médecine, et souvent en tant que véhicules de stabilisation et de protection [40].

1.2. Problèmes posés par l'utilisation des liposomes comme vecteurs de substances médicamenteuses

Afin d'optimiser l'emploi des vecteurs liposomaux, plusieurs améliorations doivent être apportées concernant les rendements d'incorporation du principe actif [41, 42]. On devra également établir des moyens pour s'affranchir du tropisme trop exclusif des liposomes à l'égard du SRE, ainsi qu'élucider l'influence des composantes du milieu biologique sur

la stabilité des porteurs liposomaux [43, 44]. En pharmacologie, le problème est principalement le manque de spécificité de l'interaction entre le médicament et le site d'action sur la cellule ciblée [45]. De nombreuses difficultés se posent également quant à la fabrication et la conservation à long terme des liposomes pour des fins d'utilisation industrielle [46].

Les premières améliorations substantielles ont été observées suite à l'incorporation de gangliosides. Il a été démontré que ces derniers agissent de façon synergique avec le cholestérol, afin d'augmenter la stabilité des liposomes dans le plasma [47]. D'autre part, l'inclusion d'un manteau hydrophile de polymères de glycol [48], s'est traduite par une augmentation significative de la demi-vie des liposomes dans le sang. Ces polymères amphiphiles minimiseraient les interactions non-spécifiques entre les liposomes et les protéines plasmatiques comme les opsonines, prolongeant ainsi la demi-vie des liposomes dans le sang [49].

Des approches similaires ont été mises au point avec d'autres particules colloïdales, comme les particules de latex [50], à la surface desquelles on retrouve des copolymères de type blocs ou séquencés, [51] tels que le poly(éthylène) glycol-polypropylène oxide (PEG-PPO). Celles-ci ont démontré des changements pharmacocinétiques similaires à ceux obtenus avec les liposomes "pegylés" [52].

1.2.1. Stabilité des liposomes

La stabilité chimique des lipides qui les composent est souvent compromise par des réactions chimiques ou enzymatiques d'hydrolyse ou d'oxydation. Les réactions d'oxydation introduisent dans bien des cas, des changements de composition et de conformation de membranes liposomales, provoquant parfois l'agrégation ou la fusion des liposomes, la formation de peroxydes toxiques ainsi que la libération de leur contenu [53].

D'autre part, la stabilité physique des liposomes implique la rétention des composés incorporés, le maintien des dimensions des vésicules, de leur structure et de leur forme. Enfin, la stabilité biologique peut varier selon l'influence éventuelle des liquides biologiques sur l'intégrité et la perméabilité des liposomes.

1.2.2. Stabilité des liposomes dans les liquides biologiques

Selon la voie d'administration utilisée, les liposomes seront au contact de liquides biologiques aussi divers que le sang, les sucs digestifs, les liquides interstitiels et synoviaux. Par conséquent, les problèmes de stabilité devront être étudiés en des termes différents. Ainsi, il est indispensable qu'après leur administration par voie orale, les liposomes demeurent insensibles aux variations de pH rencontrées, à l'action des sels biliaires, des nucléases et des enzymes lipolytiques telles que les lipases et les phospholipases [54]. L'étude réalisée par Rowland et Woodley rend parfaitement compte de l'instabilité des liposomes au contact des sels biliaires. L'incubation à 37°C des liposomes neutres, anioniques ou cationiques avec un mélange de sels biliaires (concentration finale de 10 mM), dont la composition est voisine de celle du contenu intestinal humain, présentent une grande instabilité, démontrée par plus de 80 % de libération de l'inuline en 30 minutes [55]. Par voie intraveineuse, trois mécanismes sont responsables de la modification de l'intégrité structurale des liposomes. Les interactions des liposomes avec des protéines plasmatiques telles que les opsonines, l'albumine et les fibronectines, sont susceptibles de déclencher l'activité phagocytaire des macrophages [56, 57]. Des échanges ou transferts lipidiques lors de collisions, soit entre les liposomes et certains constituants plasmatiques (comme les lipoprotéines), soit entre les liposomes et les membranes cellulaires, aboutissent souvent à la déstabilisation des liposomes, ou même à la désintégration des membranes liposomiques [58, 59]. Finalement, la demi-vie des liposomes peut être considérablement réduite par la liaison directe des liposomes à des protéines cellulaires, suivi de leur phagocytose par les macrophages du foie ou de la rate [60].

1.2.2.1. Stabilité des liposomes en présence de sérum

Le rôle néfaste du sérum sur l'intégrité des liposomes a été signalé par Arakama et al., [61] qui ont démontré, en outre, que l'incorporation du cholestérol dans la membrane des liposomes, permet d'atténuer la fuite de la substance active incorporée. En 1977, Zborowski et al., ont mis en évidence que l'incubation des liposomes avec du sérum entraîne une libération importante de marqueurs incorporés, tels que le saccharose ou l'inuline, mais également celle de substances de masse moléculaire élevée comme l'albumine sérique [62].

1.2.2.2. Stabilité des liposomes en présence des lipoprotéines humaines

Dans un milieu aussi complexe que le sang, de nombreux constituants peuvent, à priori, interagir avec les liposomes et provoquer leur déstabilisation. Parmi les constituants plasmatiques, ce sont surtout les lipoprotéines qui semblent responsables de la déstabilisation des liposomes et plus particulièrement, les HDL. Les lipoprotéines sont des macromolécules endogènes constituées d'un coeur de triglycérides et d'esters de cholestérol, entouré par une monocouche de PL dans laquelle sont logés des apoprotéines et du cholestérol [63]. Les mécanismes évoqués pour rendre compte de l'instabilité des liposomes au contact des lipoprotéines humaines, particulièrement celles de haute densité, ne sont pas clairement élucidés et sont vraisemblablement complexes, mais des études laissent entrevoir que le transfert des PL des liposomes sur les HDL a comme conséquence une destruction totale de la membrane liposomique ou la formation de pores à travers cette membrane qui faciliteraient la libération du principe actif [64].

1.2.3. Principaux problèmes posés par l'étude pharmacocinétique des liposomes et des substances actives qu'ils contiennent

L'atteinte d'un organe cible par un liposome contenant une substance active présuppose, non seulement que le liposome soit structurellement intact en tant que vecteur vésiculaire, mais également qu'il contienne à l'arrivée, la substance incorporée au départ. La distribution tissulaire des liposomes devrait logiquement dépendre de plusieurs facteurs tels que: la composition de la paroi liposomique, la taille et la charge

du vecteur, les interactions possibles avec des constituants endogènes (protéines en particulier), ainsi que du flux sanguin irriguant les organes ou tissus [65]. Plusieurs études font état d'une modification substantielle de la distribution tissulaire de divers principes actifs [66], en particulier celle des substances antitumorales incorporées dans les liposomes. Le fait de retrouver de fortes concentrations de substances traceuses au niveau des organes riches en cellules du SRE (foie, rate moelle osseuse) [67], a conduit à approfondir l'étude de la distribution hépatique des liposomes entre, d'une part, les cellules parenchymateuses, et d'autre part, les cellules de Kupffer [68]. De plus, de nombreux efforts sont consacrés au développement d'une nouvelle génération de liposomes plus stables, capables de résister à leur capture par le SRE, pour des applications thérapeutiques excluant le SRE [69].

Le problème majeur qui se pose dans l'étude de la distribution intracellulaire ou intratissulaire des liposomes, est donc de savoir si ces vecteurs sont capables de franchir la barrière des membranes cellulaires. Les résultats obtenus par Poste et al., [65] ont montré que des liposomes intacts traversent la barrière capillaire des réseaux hépatique et splénoïque, en raison de sa discontinuité et de la présence de fenestrations et d'interstices sinusoïdaux. Cependant, les liposomes franchissent difficilement par eux-mêmes, les barrières continues comme celles des poumons, du système nerveux central ou des muscles [70].

1.2.4. Problèmes technologiques posés par l'utilisation des liposomes comme vecteurs de substances médicamenteuses

1.2.4.1. Conditions de fabrication

L'obtention de lots de liposomes homogènes, uniformes, conservés à long terme pour des fins d'utilisation industrielle est un facteur important. Les problèmes techniques de préparation des complexes stables n'ont pas encore été résolus. Assez peu de travaux ont été faits pour évaluer de façon systématique l'influence des conditions de fabrication sur les caractéristiques des liposomes. En ce qui concerne les liposomes multilamellaires, la distribution granulométrique, le nombre de lamelles et l'efficacité d'incorporation

dépendent, par exemple de la durée et du taux d'hydratation précédant l'agitation mécanique [71].

Les dimensions des MLV sont dans bien des cas, très hétérogènes. L'extrusion des MLV à travers les membranes de polycarbonate ayant des pores de dimension bien définie, permet d'uniformiser et de diminuer la taille de la préparation liposomale [72]. La préparation des SUV par sonification des MLV, est la plus largement utilisée. Grâce à cette technique décrite par Huang [73], on arrive à obtenir des vésicules homogènes en dimension et entourées d'une seule couche bilamellaire.

1.2.4.2. Conservation des liposomes

L'instabilité des liposomes est un problème complexe recouvrant en réalité un ensemble de phénomènes. Sur le plan chimique, l'une des difficultés à résoudre est surtout celle liée à l'auto-oxydation des PL; sur le plan physique, les problèmes majeurs sont ceux posés par l'agrégation des vésicules et par la modification de la perméabilité de leur paroi, avec pour conséquence la libération du principe actif incorporé.

1.3. Effet du poly(éthylène) glycol (PEG) sur les liposomes

Dans le but de s'affranchir du tropisme trop exclusif des liposomes à l'égard du SRE, et de favoriser la livraison spécifique du principe actif ailleurs que dans les organes du SRE, des études ont démontré que l'ajout des glucides [74] et des polysaccharides, tels que les monogangliosides (GM1) [75], attachés à la surface des liposomes, contribue à augmenter significativement leur temps de circulation dans le sang. En vue d'optimiser la stabilité des liposomes, de nombreuses études sont consacrées au développement d'une nouvelle génération de liposomes communément appelés "Stealth liposomes®"[69]. Des composés synthétiques dans lesquels un polymère hydrophile, comme le PEG, greffé chimiquement au groupe de tête d'un phospholipide tel que la PE, sont utilisés pour augmenter la demi-vie des formulations liposomales dans le sang [76]. De plus, l'utilisation de PEG a permis de résoudre les problèmes liés aux coûts élevés des GM1, ainsi que les difficultés rencontrées dans leur purification. La présence du PEG à la surface des liposomes, confère aux liposomes de nombreux avantages dont une

diminution de la capture des liposomes par le SRE, une augmentation de la demi-vie des liposomes, reliée à une plus grande accumulation de ces derniers dans les sites tumoraux *in vivo* [77], ainsi qu'une diminution de la fuite du principe actif des liposomes [78].

La couche protectrice hydrophile du PEG forme un nuage de chaînes polymériques de densité suffisamment élevée pour offrir une protection aux liposomes vis-à-vis des interactions avec les opsonines. À cause de la flexibilité des chaînes du PEG et de la rapidité avec laquelle le PEG change de conformation, certains proposent que les opsonines ne s'adsorbent plus aussi facilement sur les liposomes [79].

Le PEG a été utilisé dans un grand nombre de formulations liposomiques pour augmenter le rayon de solvation des liposomes, et pour réduire les interactions entre les protéines plasmatiques et les liposomes [80, 81]. Le dipalmitoylephosphatidyléthanolamine-poly(éthylène) glycol (DPPE-PEG) et le cholestérol-PEG peuvent neutraliser la charge nette (potentiel ζ), exposée à la surface des liposomes contenant l'acide myristique [82]. De plus, des études laissent entrevoir que le caractère linéaire de l'ADN, faciliterait son insertion entre les bras du PEG [83].

Le(s) mécanisme(s) détaillé(s) d'interaction des dérivés de PEG à la surface des liposomes, ainsi que leur comportement vis-à-vis de différents constituants de l'environnement biologique, sont des aspects qui demandent encore à être élucidés. Malgré ses effets indéterminés sur la transfection de plasmides complexés aux liposomes, le PEG ne semble pas affecter la vectorisation intracellulaire ou l'activité liposomale des oligonucléotides antisens [84]. Une étude a démontré que la présence du DPPE-PEG à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, réduit significativement la charge à la surface de ces liposomes, tout en permettant aux liposomes d'interagir avec l'ADN génomique ou plasmidique [83]. En plus des chaînes de PEG, d'autres polymères sont actuellement évalués, tels que le poly(acrylamide) ou le poly(vinylpyrrolidone) (PVP) [85].

1.4. Applications thérapeutiques

Bon nombre d'applications thérapeutiques et cliniques utilisent couramment les liposomes comme vecteurs de transport des substances biologiquement actives, pour le traitement et la prévention de divers cancers, de maladies pulmonaires ou inflammatoires, de maladies d'origine microbiennes, bactériennes et virales [86].

1.4.1. Thérapie antitumorale

Parmi les travaux les plus prometteurs, notons ceux réalisés avec les antibiotiques de type anthacycline. Publiés en 1981 par Forssen et Tokes [87], et en 1982 par Rahman et al., [88] ainsi que par Litterst et al., [89], les travaux sur la doxorubicine ont démontré que peu importe la voie d'administration et le type de liposomes utilisé, l'incorporation de la doxorubicine dans les liposomes a pour conséquence de modifier la biodistribution tissulaire de cette substance antitumorale, et de diminuer les risques potentiels de cardiotoxicité. Les travaux de Juliano et al., [90, 91] ont suggéré que les liposomes ralentissent le métabolisme, ainsi que l'élimination des substances antitumorales et peuvent pour cette raison, accroître et prolonger leur efficacité.

Durant les vingt dernières années, bon nombre de recherches ont abouti au développement de diverses formulations de "liposomes-injectables", commercialisées (Doxil®) en Europe et aux États-Unis, certaines attendent d'être approuvées et d'autres sont en phases cliniques I-III [92]. Les antibiotiques de type anthracycline sont utilisés abondamment pour le traitement d'une variété de cancers [93]. Cependant, leur utilisation est limitée par de sévères effets secondaires, comme des dommages cardiaques irréversibles. Néanmoins, des études pré-cliniques et cliniques chez les animaux [94, 95] ont révélé que l'administration des anthracyclines incorporées dans les liposomes ou non, conduit à une réduction importante de la concentration des anthracyclines dans le cœur, accompagnée par une diminution significative de la toxicité cardiaque. L'inclusion des GM1 ou du DSPE-PEG dans les liposomes contenant la doxorubicine, a significativement contribué à augmenter le temps de circulation de ces liposomes *in vivo* [96].

1.4.2. Traitement de la polyarthrite rhumatoïde

Parmi les traitements conventionnels de la polyarthrite rhumatoïde, il y a l'injection intra-articulaire des stéroïdes à l'état libre, tels que l'hydrocortisone, la prednisolone ou la triamcinolone. Cependant, plusieurs inconvénients ont été signalés suite à l'administration de ces stéroïdes, comme la présence de réactions locales indésirables, une élimination trop rapide des stéroïdes de l'espace synovial, une diminution de la résistance aux infections, ainsi que l'apparition possible d'effets secondaires comme l'ostéoporose, l'insuffisance surrénalienne dus au passage des stéroïdes dans la circulation générale [97]. En 1976, Dingle et al., ont proposé l'incorporation des stéroïdes dans les liposomes [98]. Selon ces auteurs, l'activité de la préparation de DPPC/AP contenant le palmitate d'hydrocortisone, serait 20 fois supérieure à celle du stéroïde non-incorporé [99].

D'autres médicaments couramment utilisées sont les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) comme l'aspirine, l'indométhacine, le diclofinac et l'ibuprofène [100, 101]. Ces médicaments sont de puissants inhibiteurs des cyclo-oxygénases (ou prostaglandines synthétases) constitutives COX-1 [102, 103] et inductives COX-2 [104, 105].

En vue de minimiser les effets secondaires indésirables souvent occasionnés par les traitements conventionnels et d'améliorer l'efficacité thérapeutique, des études sont actuellement en cours en vue de développer des vecteurs de transports de gènes à potentiels "anti-arthritiques". Les rétrovirus font l'objet de nombreux essais cliniques, ces derniers ont été utilisés notamment, pour le transfert d'un antagoniste du récepteur de l'interleukine-1 (IL-1Ra) dans les cellules synoviales de lapins [106]. L'expression de IL-1Ra semble décliner avec le temps pour des raisons qui demeurent encore très peu élucidées [107].

Des études récentes effectuées par Nita et ses collaborateurs, ont démontré qu'une réaction inflammatoire est obtenue suite à l'injection intra-articulaire des liposomes

cationiques dans les genoux des lapins [108]. Ainsi, afin de tenter d'expliquer ces résultats, la stabilité des liposomes cationiques dans l'environnement synovial et la rétention liposomale de l'ADN plasmidique ont été évaluées (se référer à l'article dans l'annexe I intitulé: "Cationic liposome stability in synovial fluid").

1.4.3. Utilisation des liposomes comme adjuvants d'immunisation

1.4.3.1. Vaccins liposomaux

Vingt ans après la découverte des propriétés immunoadjuvantes des liposomes, une première formulation de vaccin liposomique (contre l'hépatite A) a été commercialisée pour être utilisée chez les humains [109]. Les mécanismes par lesquels les liposomes induisent des réponses immunitaires en présence d'antigènes, ne sont pas à ce jour, clairement élucidés. L'activité immunoadjuvante des liposomes a été attribuée à un mécanisme de dépôt (libération lente de l'antigène) et à l'habileté à la fois des liposomes et de l'antigène de migrer vers les régions lymphatiques, après l'infection locale [110]. L'activité immunoadjuvante des liposomes administrés par voie orale, a été attribuée à leur endocytose par les cellules M qui résident dans les plaques de Payer de l'intestin. Ces dernières faciliteraient par la suite, l'acheminement de l'antigène aux cellules lymphoïdes [111]

Les liposomes offrent des avantages considérables pour la vaccination et en tant que porteurs de médicaments, afin de traiter le SIDA [112]. Leur abilité à agir comme immunoadjuvant améliore significativement l'indice thérapeutique et la pharmacocinétique de l'AZT [113].

1.5. Utilisation des liposomes pour le transfert et l'expression des gènes

La thérapie génique est une stratégie qui implique l'administration de gènes en vue de modifier le répertoire somatique des cellules ciblées pour des fins thérapeutiques et ce, autant pour des maladies héréditaires que acquises [114]. La réparation de gènes anormaux, dont la mutation est responsable de maladies, ou le remplacement de gènes

manquants, s'avèrent des applications cliniques potentielles en thérapie génique [115]. Probablement d'une plus grande importance est l'utilisation de gènes comme médicaments, pour traiter n'importe quel type de maladies, à partir du moment où elle peut bénéficier d'une protéine thérapeutique, qu'il s'agisse d'une hormone, d'une cytokine, d'un facteur de croissance ou de coagulation, de médicaments protéiques anti-viraux, anti-microbiens, antitumoraux et bien d'autres encore [116]. Dans tous ces cas, on peut envisager d'administrer un gène qui va commander la synthèse et la délivrance de la protéine en question dans l'organisme. La thérapie génique au niveau du foie a un avenir particulièrement très prometteur, puisque le foie est un organe où plusieurs désordres métaboliques se manifestent, affectant non seulement sa fonction métabolique, mais aussi sa capacité de sécréter des protéines du sérum [117].

Les tissus peuvent être modifiés génétiquement de deux façons. Par une approche indirecte, le "gène-médicament" est transplanté dans les cellules de l'organisme à traiter, après avoir modifié génétiquement les cellules en culture *in vitro*; c'est la thérapie génique *ex vivo*. Dans d'autres cas, le "gène-médicament" est administré directement dans l'organisme à traiter *in vivo*, soit par l'intermédiaire de vecteurs viraux ou de vecteurs non-viraux de gènes [118].

Les progrès futurs dans l'utilisation des systèmes non-viraux seront réalisés en considérant particulièrement les contraintes de l'environnement biologique sur le destin et la fonction de l'ADN et des porteurs liposomaux dans le corps et dans la cellule. En effet, la biodisponibilité de l'ADN dans le corps est gouvernée par ses propriétés physiques, incluant sa taille, sa charge, ses caractéristiques de surface, ses interactions avec les protéines du sérum et avec les surfaces des cellules. Avec un diamètre hydrodynamique en suspension aqueuse de plus de 100-200 nm, il est peu probable que l'ADN diffuse plus loin des sites d'injections interstitiels, ou qu'il traverse efficacement les barrières des cellules endothéliales, épithéliales, des kératinocytes ou des cellules de la barrière encéphalique. De plus, à cause de la taille et de la charge de l'ADN, ainsi que des barrières membranaires et enzymatiques imposées par les cellules, l'entrée spontanée

de l'ADN intègre dans les cellules, et son expression subséquente dans le noyau, s'avèrent dans bien des cas, des procédés très inefficaces. Il est également fort probable que l'introduction de l'ADN dans le système vasculaire entraîne sa dégradation par les nucléases, son opsonisation, sa distribution dans d'autres compartiments biologiques et son assimilation par les cellules du SRE (cellules de Kupffer ou macrophages de la rate) [119].

1.5.1. Vecteurs viraux et non-viraux de gènes

Pour satisfaire les besoins cliniques, de nombreuses recherches sont orientées vers le développement de méthodes de livraison de gènes, qui ne nécessitent pas de vecteurs viraux ou de transplantation cellulaire, mais qui représentent plutôt des formulations pharmaceutiques de gènes. L'introduction de termes tels que "gènes-médicaments" ou "gènes en bouteilles", reflètent l'apparition de nouvelles technologies qui permettent aux gènes d'être formulés comme des produits pharmaceutiques conventionnels, et administrés directement aux patients [121]. Les systèmes non-viraux de livraison de gènes sont souvent appelés des "virus artificiels", car ces derniers imitent certaines fonctions biologiques similaires aux systèmes viraux. Néanmoins, les systèmes non-viraux diffèrent fondamentalement des systèmes viraux par leur composition, fabrication, caractérisation, et par leur profil thérapeutique. De plus, chacun d'eux peut être à l'origine de problèmes cliniques et commerciaux bien distincts. Le principe de livraison de gènes par les vecteurs viraux repose sur le fait que les gènes codant pour des fonctions virales, peuvent être remplacés par des gènes qui codent pour des fonctions thérapeutiques spécifiques [122].

Parmi les vecteurs viraux utilisés, on distingue principalement les rétrovirus [123], les adénovirus [124], et un virus pour lequel l'adénovirus est un virus auxiliaire, appelé communément adénovirus associé à un virus [125]. Les rétrovirus sont jusqu'à maintenant, parmi les vecteurs viraux les plus utilisés dans la majorité des essais thérapeutiques (dirigés contre des désordres héréditaires ou acquis) en thérapie génique chez les humains. Les vecteurs viraux utilisent la capacité du virus d'exprimer l'information génétique dans les cellules infectées. Certains virus, comme les rétrovirus,

induisent une expression stable d'un gène dans des cellules, en intégrant le gène viral directement dans le chromosome de la cellule hôte. Dans bien des cas, les virus maintiennent le gène viral dans une période latente dans le noyau. Plusieurs virus ont également des mécanismes facilitant la biodisponibilité des gènes dans les cellules. Ces virus permettent aux gènes viraux d'échapper à la destruction par le système immunitaire, avant de rejoindre la cellule cible, ou d'échapper à leur dégradation dans les endosomes, après leur endocytose par la cellule visée [126].

De nombreux modèles animaux démontrent que les méthodes non-virales de livraison de gènes sont moins efficaces que les méthodes virales, pour introduire des gènes dans un grand nombre de cellules *in vivo* [127]. Cependant, il n'en reste pas moins que la thérapie virale présente de nombreux inconvénients. La présence de petits éléments viraux résiduels, à l'intérieur même des vecteurs viraux, est susceptible de déclencher des réponses immunitaires et d'induire des problèmes de toxicité et de risques potentiels de mutations, de recombinaisons ou d'inversions génétiques [128]. À cela s'ajoutent l'instabilité des particules virales, et leur coût élevé de production à grande échelle [129].

Ainsi, bien des efforts sont orientés vers le développement de méthodes non-virales de transfert de gènes. Ces approches emploient des complexes d'ADN, contenant des lipides cationiques [130], des protéines ou des peptides, comme les conjugués de poly-L-lysine [131], des liposomes [132], des transporteurs polymériques [133], ainsi que des ligands capables de faciliter un ciblage des complexes d'ADN vers des récepteurs spécifiques à la surface des cellules. Depuis 1995, plus d'une douzaine d'essais cliniques sur l'utilisation des systèmes non-viraux de livraison de gènes, sont approuvés par des agences régulatrices aux États-Unis et en Europe. Ces systèmes non-viraux de livraison de gènes sont utilisés dans des applications thérapeutiques chez les humains, pour la livraison "sécuritaire" de gènes aux poumons, au foie, aux cellules épithéliales, endothéliales et tumorales (se référer au tableau 1).

Tableau 1. Cibles pour le transfert *in vivo* de gènes par les méthodes non-virales

<i>Cibles somatiques</i>	<i>Méthodes</i>
Muscle squelettique	ADN, sucrose hypertonique, bupivicaïne, cadiotoxine <i>Naja nagricollis</i> , fusil à gène
Muscle cardiaque	ADN
Poumons- voie intraveineuse ou intratrachéale	Lipides cationiques
Endothélium	Lipides cationiques, hydrogel ^a
Foie	Liposomes, complexes asialoprotéine: polylysine, galactosyl-polylysine, virosomes, fusil à gène, ligands de tris-galactosyl
Peau	Fusil à gène, injection à jet
Cellules cancéreuses	Lipides cationiques ^a
Thyroïde	ADN
Synovium	ADN
Reins	Virosomes
Systèmes nerveux central	ADN

^a Formulations en phase clinique I

Source: Référence 130

1.5.2. Systèmes non-viraux de livraison de gènes

La transfection *in vitro* de cellules en culture avec des plasmides d'ADN, est un modèle important pour la livraison de gènes par des méthodes non-virales. Bien que certains modèles *in vitro* sont des représentations imparfaites des fonctions *in vivo*, ils sont importants pour le développement et la compréhension des processus de livraison et d'expression des gènes. Certains ont même contribué à valider l'emploi de plusieurs systèmes de livraison de gènes, utilisés dans des modèles chez les animaux et dans des essais cliniques [122].

1.5.2.1. Méthodes physiques de livraison des gènes

1.5.2.1.1. *Transfection*

Une des premières méthodes de transfert d'ADN dans les cellules en culture a impliqué la précipitation de l'ADN avec du phosphate de calcium et l'application du précipité sur la monocouche de cellules [134]. Les mécanismes détaillés de la transfection par précipitation au phosphate de calcium ne sont pas caractérisés. On croit que l'ADN forme un complexe avec le calcium, cette particule précipiterait à la surface des cellules en culture, facilitant ainsi l'endocytose des complexes [135]. L'efficacité de transfection de l'ADN précipité au phosphate de calcium dépend notamment, de la qualité de la réaction de précipitation et de la taille du précipité formé. Cependant, cette méthode chimique d'introduction de l'ADN peut être assez néfaste pour les membranes cellulaires [136], et inappropriée pour des manipulations *in vivo*. Dans des conditions idéales, la transfection par ces méthodes résulte en une capture de l'ADN par environ 10-50% des cellules en culture. La plupart de l'ADN introduit dans les cellules par transfection, ne s'intègre pas dans le chromosome de la cellule hôte, mais réside plutôt de façon transitoire dans le noyau comme un élément extra-chromosomal. L'intégration stable du plasmide transféré est observée *in vitro* à basse fréquence (1 à 10 cellules sur 100,000).

1.5.2.1.2. *Micro-injection de l'ADN*

La micro-injection de l'ADN dans le noyau des cellules en culture, se traduit par une intégration occasionnelle des gènes recombinants dans la cellule hôte [137]. Le nombre de cellules qui peuvent être transformées par cette méthode est relativement faible et la micro-injection de l'ADN a peu d'applications en thérapie génique.

1.5.2.1.3. *Bombardement de l'ADN avec des microparticules*

Le bombardement de l'ADN lié à des microparticules est une méthode analogue à la méthode d'injection directe de gènes dans les cellules. Cette technique implique la précipitation de l'ADN sur des microparticules projetées dans les cellules à l'aide d'appareils explosifs à propulsion de gaz [138]. Lorsque l'ADN arrive sur les cellules, il est graduellement relâché, et exprimé par la suite dans les cellules. Cette méthode a été utilisée pour l'expression transitoire de gènes dans une variété de types cellulaires en

culture, incluant les cellules humaines d'origine épithéliale, endothéliale, les fibroblastes, les lymphocytes, ainsi que dans les cellules primaires, comme les lymphocytes, monocytes et les fibroblastes. L'intégration de l'ADN après bombardement de microparticules est réalisée dans 1 à 10 sur 100,000 cellules [139].

1.5.2.1.4. Électroporation

Une autre méthode de transfert de gènes *in vitro* couramment utilisée est l'électroporation, où les cellules sont exposées à de hauts voltages [140]. Les conditions d'électroporation (voltage, capacitance, pulsations dynamiques) ont besoin d'être ajustées à chaque type cellulaire, afin d'optimiser l'efficacité de transfection et la fraction de cellules survivantes. Dans plusieurs lignées cellulaires, et dans certaines cellules primaires, l'électroporation permet la transfection de plus de 90% de cellules.

1.5.2.1.5. Lipides cationiques et liposomes

Les lipides cationiques sont un des plus prometteurs systèmes non-viraux de livraison de gènes utilisés en thérapie génique [141, 142]. Les lipides cationiques sont des composés importants pour élucider les mécanismes de transfert et d'expression de gènes *in vitro* [143]. En 1987, Felger et al., ont synthétisé le premier prototype de lipide cationique amphiphile d'ammonium quaternaire, le bromure de dioléoyloxypropyl triméthylammonium (DOTMA), utilisé pour le transfert de gènes [144]. Les formulations d'ADN avec des lipides cationiques, tels que DOTMA, ont généré des complexes ADN-DOTMA capables d'introduire l'ADN avec une grande efficacité dans de nombreuses cellules. Ces méthodes assurent des efficacités de transfection de plus de 90% dans différents types cellulaires et s'avèrent dans certains cas, 100 fois plus efficaces que les méthodes de précipitation au phosphate de calcium [145].

Actuellement, de nombreuses formulations de lipides cationiques commercialisées (Lipofectin™, Lipofectamine™, Transfectam™) sont couramment utilisées comme outils de recherche [146]. La Lipofectin™, [147], un mélange équimolaire du lipide cationique DOTMA et du lipide fusogénique neutre DOPE, a été la première formulation liposomale à transférer d'ADN [148] et d'ARN [149] dans différentes lignées cellulaires eukaryotes, après le simple mélange de ces liposomes cationiques avec les acides

nucléiques (par opposition à l'incorporation des acides nucléiques dans l'espace aqueux ou dans les bicouches phospholipidiques des liposomes). Les lipides cationiques facilitent plutôt le resserrement de l'ADN, via des interactions ioniques entre les lipides cationiques et l'ADN. Ceci est à l'origine de la formation d'un complexe ADN plasmidique-lipides cationiques, qui contient plusieurs plasmides liés par des liaisons hydrophobes avec les lipides cationiques [150]. La taille, la charge des complexes ADN plasmidique-lipides cationiques et l'efficacité de livraison des gènes, peuvent être optimisées en modifiant la composition des lipides cationiques et de l'ADN [144].

Un modèle hypothétique suggère que l'ADN induit la fusion des lipides cationiques en des bicouches lipidiques plus allongées, entre lesquelles s'insèrent les acides nucléiques. De plus, la fusion des lipides cationiques en bicouches lipidiques plus allongées est accompagnée par un changement de conformation de l'ADN (probablement par resserrement de l'ADN en boule) [151]. Behr a été le premier à démontrer la resserrement de l'ADN et son recouvrement par les lipides cationiques synthétiques [150]. Cette méthode de recouvrement de l'ADN par les lipides cationiques, par simple mélange aliène beaucoup moins les propriétés physico-chimiques des complexes ADN-lipides cationiques, comparée aux méthodes conventionnelles d'extrusion [152], d'évaporation en phase inversée [153], de déshydratation et réhydratation [154].

Depuis l'introduction du modèle Lipofectin en 1987, un bon nombre de formulations de lipides cationiques ont vu le jour [155, 156]. Actuellement, différents systèmes de vecteurs non-viraux de gènes comme DOTMA et DMRIE [157], DOTAP [158] ainsi que des lipides cationiques contenant la polylysine [159], comme le DC-cholestérol [160], font l'objet de nombreuses études pré-cliniques et cliniques, pour traiter des maladies pulmonaires comme la fibrose kystique et les cancers du mélanome, du côlon, des reins ou des seins [120].

Les poumons apparaissent particulièrement susceptibles au transfert de gènes par les lipides cationiques. Ces derniers ont été utilisés pour délivrer des gènes administrés par

la voie intraveineuse ou intratrachéale, chez plusieurs espèces incluant les rats, les souris et les moutons [161]. Les efficacités d'expression de la α_1 -antitrypsine [162] et du gène transmembranaire régulateur de la fibrose kystique [163] dans les poumons de différents modèles chez les animaux, ont conduit à de nombreuses études cliniques. L'expression de gènes associés aux lipides cationiques et administrés par voie intraveineuse, s'est avérée variable dans l'endothélium et dans d'autres tissus pulmonaires [164]. Le mécanisme par lequel les complexes ADN-lipides cationiques ciblent les poumons après leur administration par voie intraveineuse, demande encore à être élucidé. Les particules présentant des diamètres supérieurs à 1-2 μm , sont reconnues pour se loger dans les lits capillaires pulmonaires. Bien que l'agrégation dans le sang des complexes ADN-lipides cationiques (diamètres entre 100-200 nm), pourrait faciliter la vectorisation des lits capillaires pulmonaires par ces mécanismes, aucune évidence significative d'embolisation dans les poumons n'a été observée. Un mécanisme plus probable est la clairance des complexes ADN-lipides cationiques par l'effet du "premier passage" (premier lit vasculaire rencontré après l'administration intraveineuse des complexes ADN-lipides cationiques) dans les poumons. Cette clairance pourrait être due à des interactions ioniques ou hydrophobes entre les particules et les capillaires de l'endothélium pulmonaire [165].

De nombreuses études ont fait état de l'administration directe des complexes ADN-lipides cationiques dans les masses cancéreuses, en vue d'une thérapie antitumorale. Des études chez les souris ont démontré une grande efficacité du transfert et d'expression des gènes, ainsi que la présence d'une réponse immunitaire contre la tumeur, suite à l'injection directe des complexes ADN-lipides cationiques dans les cellules cancéreuses [166]. Des essais cliniques ont été proposés utilisant les lipides cationiques pour délivrer des gènes codant pour l'interleukine-2 (IL-2) dans les tumeurs, afin de promouvoir une réponse anti-inflammatoire antitumorale [167]. Les lipides cationiques ont également été utilisés pour introduire des gènes dans les cellules endothéliales [168].

Les liposomes conventionnels ont été utilisés comme vecteurs de livraison de gènes [169]. Des études comparatives ont démontré que les liposomes conventionnels sont moins efficaces que les liposomes cationiques en tant que système de transport et de livraison d'ADN *in vitro* [170].

Apparus dans les années 1980, les liposomes cationiques ont été depuis utilisés pour livrer l'ADN [171], l'ARN messager [172], les oligonucléotides antisens et les protéines [173] dans les cellules eukaryotes. *In vitro*, le rapport molaire des complexes ADN-liposomes cationiques, la quantité de complexe ajoutée, la densité des cellules au moment de la transfection et la présence de cellules en suspensions ou adhérentes, sont des paramètres qui doivent particulièrement être examinés afin d'optimiser l'efficacité de transfection [174]. De plus, la composition du milieu de transfection (présence ou absence de sérum), la présence ou non d'agents lysomotrophiques, ainsi que la durée d'incubation des complexes ADN-lipides cationiques avec les cellules, avant l'analyse spectrofluorimétrique de l'activité enzymatique associée à l'ADN [174], sont également d'autres facteurs susceptibles d'influencer l'efficacité de transfection.

De tous les vecteurs non-viraux explorés, les liposomes cationiques ont fourni les résultats les plus prometteurs basés sur la combinaison d'efficacité et de stabilité [175]. Certains prétendent que les liposomes cationiques interagissent avidement et spontanément avec les charges négatives des acides nucléiques [176].

Les complexes ADN plasmidique-liposomes cationiques présentent de nombreux avantages comme vecteurs de transfert de gènes. Contrairement aux vecteurs viraux, les complexes ADN-liposomes cationiques peuvent être utilisés pour le transfert et l'expression d'ADN de taille essentiellement illimitée [177]. De plus, par opposition aux vecteurs viraux, les liposomes ne peuvent se répliquer ou se recombiner pour former des agents infectieux [178].

Durant les dernières années, des études ont démontré l'utilité des liposomes cationiques pour la transfection *in vivo* à la fois chez les animaux et chez les humains [179]. Notamment, chez les poulets, l'injection intramusculaire d'un plasmide linéarisé complexé au modèle liposomal Lipofectin™, est responsable d'une production importante d'anticorps contre le virus I de la maladie de "Newcastle", comparé à l'injection intramusculaire du plasmide sous sa forme circulaire associé au modèle Lipofectin™ [180].

Malgré des résultats encourageants, les problèmes techniques de préparation des complexes stables, n'ont pas encore été résolus. L'instabilité structurale des complexes liposomes cationiques-ADN plasmidique, les risques potentiels associés avec la toxicité des lipides cationiques (inhibition de la PKC) [181] et le déclin avec le temps de leur activité de transfection [182], sont des problèmes importants auxquels on est encore confronté. Il s'est avéré également très difficile d'obtenir des complexes homogènes d'ADN-liposomes cationiques, ayant une distribution de taille appropriée pour injection systémique.

Ainsi, le développement de complexes ADN-liposomes cationiques plus stables est absolument nécessaire, afin de faciliter la corrélation entre les paramètres structuraux des complexes et leur activité de transfection *in vivo*. De plus, le très grand degré de variabilité de l'efficacité de transfection des complexes ADN-liposomes cationiques dans différents types cellulaires, constitue une barrière importante qui limite l'utilisation courante de ces complexes en thérapie génique. Ainsi, une plus grande compréhension et un meilleur contrôle des paramètres structuraux des complexes lipides cationiques-ADN, pourraient faciliter entre autres, une meilleure interprétation et prédiction de l'efficacité de transfection de ces complexes et élucider davantage les mécanismes de transfert et d'expression de l'ADN au sein des cellules [183]. L'environnement ionique unique conféré par la membrane lipidique, est susceptible d'avoir des effets importants sur la structure et la fonction ultime des complexes ADN-lipides cationiques. Des études de diffraction aux rayons X, d'analyse spectrofluorimétrique et de microscopie électronique

et optique, sont actuellement en cours en vue d'établir la structure et la fonction des complexes ADN-liposomes cationiques [184].

La libération de l'ADN des complexes ADN-lipides cationiques, sa livraison et son expression subséquente dans le noyau, sont des processus qui demeurent encore à ce jour très peu caractérisés [185]. La détermination de l'influence de la composition des membranes cellulaires ciblées et des mécanismes d'interaction et de fusion des complexes ADN-liposomes cationiques avec les membranes biologiques, apporteront sans doute des informations pertinentes concernant les activités de transfection très variables obtenues avec les liposomes cationiques dans différents types cellulaires [186].

1.6. Le transfert de l'ADN à travers la membrane cellulaire jusqu'au noyau

Felgner et al., [187] ont suggéré que les complexes ADN plasmidique-liposomes cationiques sont assimilés par l'endocytose. Les lipides cationiques des liposomes sont ensuite déstabilisés par le pH de la membrane endosomale/lysosomale, facilitant ainsi la libération de l'ADN vers le cytoplasme et à l'intérieur du noyau. Il est bien connu que cette déstabilisation de la membrane liposomique est accompagnée par un changement topologique de la forme de bicouche de la DOPE à une forme hexagonale, non-bilamellaire. Ce changement de conformation de la DOPE favoriserait la libération de l'ADN au noyau cellulaire. Felgner et al., n'excluent pas la possibilité que les complexes ADN-liposomes fusionnent directement avec la membrane plasmique.

1.6.1. Libération efficace de l'ADN des endosomes

À court terme, l'intégrité du gène transféré doit être maintenue jusqu'à ce qu'il atteigne le noyau. Comme déjà mentionné, ceci implique que l'ADN traverse la membrane des cellules, le cytoplasme et la matrice nucléaire sans problème considérable de dégradation. Un des facteurs limitants de l'efficacité de livraison de gènes au noyau après l'endocytose, est la dégradation rapide de l'ADN en particulier par les nucléases intracellulaires ou extracellulaires et les enzymes lysosomales (comme les protéinases, glycosidases, phospholipases, phosphatases et sulfatases) [188]. Plusieurs méthodes ont

été mises au point pour faciliter la libération rapide de l'ADN des endosomes, avant la fusion des lysosomes avec les endosomes et avant la digestion de l'ADN par les nucléases [189].

1.6.1.1. Les adénovirus

En vue d'accélérer la libération de l'ADN des endosomes et de le protéger particulièrement contre l'attaque des nucléases intracellulaires ou extracellulaires, une approche consiste à ajouter des particules d'adénovirus au mélange de transfection. Cette méthode est basée sur l'observation que les particules d'adénovirus sont capables d'induire la lyse des endosomes, durant le processus d'infection des cellules par les adénovirus [190]. La lyse de l'endosome est réalisée par une protéine présente à la surface du virus qui subit à pH acide des endosomes (entre 5.0 et 5.5), un changement de conformation dans sa structure tertiaire [191]. Ce changement de conformation génère une structure capable de pénétrer facilement la membrane des endosomes, et de libérer leur contenu dans le corps de la cellule. Lorsque l'ADN est co-intériorisé dans les endosomes avec une particule virale, l'efficacité de livraison des gènes peut augmenter à un facteur de trois [192].

1.6.1.2. Les "Cytfectins"

Les vecteurs "Cytfectins" et certains de leurs dérivés sont une nouvelle classe de molécules lipidiques chargées positivement, comme le bromure d'ammonium de 1,2-dioléoyloxypropyl-3-diméthylehydroxyéthyle (DORIE) et le bromure d'ammonium de 1,2-dimyristyloxypropyle-3-diméthylehydroxyéthyle (DMRIE). Ces vecteurs faciliteraient l'entrée des polynucléotides ou des macromolécules dans les cellules, échappant à la dégradation lysosomale [193]. La combinaison des "Cytfectins" avec les lipides neutres comme le DOPE, a généré dans bien des cas, des formulations liposomiques plus efficaces au niveau de leur activité de transfection, comparé à chacun des substituants pris individuellement [194]. Le DMRIE et le DC-cholestérol, sont actuellement utilisés dans des essais cliniques en thérapie génique chez les humains pour la livraison de l'ADN dans une grande variété de types cellulaires [195].

1.6.1.3. Les immunoliposomes sensibles au pH

Le concept de “vecteurs actifs” de livraison de médicaments dans des cellules, des tissus ou dans des organes spécifiques du corps, implique l’utilisation d’un vecteur présentant à la surface des ligands ou des anticorps capables de reconnaître et d’accéder à des sites spécifiques dans le corps. Les liposomes sensibles au pH acide des endosomes et auxquels on a greffé à leur surface des anticorps (immunoliposomes), offrent un autre moyen de minimiser la dégradation des liposomes et de leur contenu par les enzymes lysosomales. Lorsque les immunoliposomes sont exposés au milieu acide des endosomes, ces derniers sont protonnés et déstabilisés. Cette déstabilisation est accompagnée par la fusion des immunoliposomes avec les membranes des endosomes, favorisant la livraison rapide de leur contenu à un site pré-lysosomal, échappant ainsi à la dégradation par les enzymes digestives des lysosomes [186].

1.6.2. Protection des porteurs liposomaux d’ADN

Le recouvrement de l’ADN avec certaines protéines assure une meilleure protection de l’intégrité de l’ADN et favorise son interaction avec certains récepteurs protéiques spécifiques présents à la surface des membranes cellulaires. Jay et Gilbert, ont obtenu une protection 100 fois plus grande de l’ADN vis-à-vis de la digestion par la déoxyribonucléase (DNase I), en ajoutant à l’ADN des protéines (les lysozymes) dans la préparation liposomique [196]. Par ailleurs l’utilisation d’un excès de dioctadécyl amidoglycylspermine (DOGS), un lipide qui interagit fortement avec le sillon mineur de l’ADN via un groupement polyamine, génère une structure de type nucléosome, dans laquelle les molécules d’ADN sont empaquetées [197]. Il a été démontré que les composés DOGS commercialisés (TransfectamTM), transforment avec une grande efficacité, plusieurs types cellulaires [198].

Des études récentes ont démontré que des complexes ADN plasmidique-liposomes cationiques ont été préparés par recouvrement de l’ADN avec des résidus de spermidine (0.5 nmol/ μ g d’ADN) et en ajoutant une petite concentration de PEG-PE (entre 0.5% et

2% par lipides cationiques), avant la formation des complexes ADN-liposomes cationiques [199].

De nombreuses études exploitent de plus en plus la possibilité d'utiliser des micelles de lipides cationiques [200]. La petite taille des micelles de lipides cationiques (moins de 6 nm de diamètre) confère aux lipides cationiques une plus grande liberté de mouvement et une plus grande accessibilité à tous les sites de liaison de l'ADN, comparé aux lipides organisés en bicouches phospholipidiques (diamètre de 100 nm) [201]. Par conséquent, les complexes ADN-lipides cationiques micellaires, sont susceptibles d'être mieux protégés contre leur dégradation par les nucléases intracellulaires ou extracellulaires. De plus, les micelles ne sont pas des structures statiques; de nombreux échanges lipidiques ont lieu entre les micelles, favorisant ainsi une meilleure protection de l'ADN [200].

1.7. Objectifs du projet

Des études préliminaires d'interaction entre l'ADN génomique de sperme de saumon et les liposomes cationiques ont été réalisées afin de déterminer:

- Le rapport minimal DOPE:DOTAP-ADN, nécessaire pour neutraliser la charge de l'ADN.
- L'effet d'une couche de PEG à la surface des liposomes cationiques sur l'interaction DOPE:DOTAP-ADN.

Par la suite:

- L'effet de l'élévation de la température sur l'incorporation des acides nucléiques dans les liposomes cationiques "pegylés" ou non a été exploité.
- L'influence de la forme du plasmide pBR322 (circulaire ou linéarisée) sur son incorporation dans les liposomes cationiques a été évaluée.

Dans un deuxième temps, l'effet du chauffage sur l'activité biologique de l'ADN plasmidique, incorporé dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP, présentant à la surface des dérivés de PEG a été élucidé. Deux études ont été menées en parallèle, soit:

- L'insertion du plasmide pBR322 (4363 pB) libre, ou liposomal dans une souche de bactéries dérivée d'*E. coli*.
- Des essais de transfection du plasmide pSV-40- β -Gal (6821 pB) libre, ou liposomal dans les cellules de mammifères Cos-7.

Le(s) mécanisme(s) détaillé(s) d'interaction des dérivés de PEG, à la surface des liposomes, leur comportement vis-à-vis de différents constituants de l'environnement biologique, ainsi que leurs effets sur la transfection des plasmides dans divers types cellulaires, sont des aspects qui demandent encore à être élucidés. L'influence de certains constituants de l'environnement biologique, sur la stabilité des porteurs liposomaux d'ADN, particulièrement celle des porteurs liposomaux "pegylés" d'ADN a été étudiée. Les paramètres suivants ont été examinés:

- Les effets de la présence des protéines du sérum de veau dans le milieu Dulbecco (DMEM) des cellules de mammifères Cos-7, sur l'intégrité structurale des liposomes cationiques DOPE:DOTAP.
- Les effets du déoxycholate de sodium (SDS) sur l'intégrité structurale des membranes phospholipidiques des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, DOPE:DOTAP-DSPE-PEG₂₀₀₀ ou des liposomes DOPE:DOTAP-DSPE-PEG₅₀₀₀ et sur la rétention liposomale de l'ADN plasmidique.
- Les interactions entre les liposomes cationiques DOPE:DOTAP (ou leurs formes "pegylées"), et les lipoprotéines du plasma sanguin humain de haute densité (HDL), de basse densité (LDL), et de très basse densité (VLDL).
- L'influence des composants du milieu synovial sur la stabilité des liposomes cationiques ou anioniques, et la rétention liposomale de l'ADN plasmidique (se référer à l'annexe I pour l'article intitulé: "Cationic liposome stability in synovial fluid").

2. PARTIE EXPÉRIMENTALE

2.1. Produits

- Le dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), le dioléyletriméthylammonium propane (DOTAP) et le distéaroylphosphatidyléthanolaminoyl poly(éthylène) glycol (DSPE-PEG, $M_n = 2000$ ou 5000) ont été obtenus de *Avanti Polar lipids*, Alabaster, AL. É-U.
- Le cholestérol poly(éthylène) glycol (CHOL-PEG₉₀₀) a été acheté de la compagnie *Fluka*, New York, É-U.
- Le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et le dimyristoylphosphatidylglycérol (DMPG) ont été obtenus de *Northern Lipids*, Vancouver, C.B, Canada.
- L'ADN génomique de sperme de saumon et l'ARN de levure (mélange principalement formé d'ARN ribosomal et d'une plus faible proportion d'ARN messenger non-fonctionnel) ont été achetés de la compagnie *Boehringer Manneheim GmbH*, Allemagne.
- Le plasmide pBR322 a été obtenu de *Gibco BRL Life Technologies*, Grand Island N.Y, É-U.
- Le plasmide pSV- β -Gal a été acheté de la compagnie *Promega*, Madison, WI, É-U. Ce vecteur eukaryote de 6821 pB contient le promoteur constitutif SV40 et code pour la β -Gal.
- Les marqueurs de fluorescence tels que le Bromure d'éthidium (BrEt) et l'Orange d'acridine ont été obtenus de *Sigma Chemicals*, St-Louis. É-U.
- La déoxyribonucléase DNase I (une endonucléase de pancréas bovine, grade II) a été obtenue de *Boehringer Manneheim GmbH*, Allemagne.

- Le déoxycholate de sodium (SDS) a été acheté de la compagnie *Produits chimiques Américains Ltée*, Montréal, Québec, Canada.
- Le milieu de croissance des bactéries *E. coli*, le LB AGAR, Miller deshydraté (riche en tryptones, peptones et extraits de levure), a été obtenu de *Difco Laboratories* Détroit, É-U.
- L'électrophorèse des fragments du plasmide pBR322 a été réalisée sur gel d'agarose. Ce dernier a été acheté de *Gibco BRL Life Technologies*, Grand Island N.Y, É-U.
- Les cellules épithéliales de reins de singe, Cos-7 ont été gracieusement offertes par le *Département de Biochimie de l'Université de Montréal*, Montréal, Québec, Canada. Le milieu Dulbecco (DMEM), le sérum de veau et le sulfate de gentamycine ont été achetés de *Gibco BRL Life Technologies*, Grand Island N.Y, É-U.
- La solution saline équilibrée de Hank (HBSS), a été achetée de *Gibco BRL Life Technologies*, Grand Island N.Y, É-U.
- Le pyruvate, l'agent réducteur NADH et le réactif colorant 2,4-Dinitrophénylhydrazine, ont été achetés de la compagnie *Sigma Diagnostics*, St-Louis, É-U.
- Le liquide synovial, provenant de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, a été gracieusement offert par le Dr. Robin Poole de *l'Hôpital Shriner*, Montréal, Québec, Canada. L'acide hyaluronique(AH) et le sulfate de chondroïtine A (CSA) ont été obtenus de *Sigma Chemicals*, St-Louis, É-U.
- Le gel de Sépharose 2B utilisé pour la séparation par filtration sur gel sur colonne chromatographique, provient de la compagnie *Pharmacia*, Biotech, Uppsala, Suède.

- Le réactif de Bradford (Bleu de Coumassi) a été acheté de la compagnie ***Biorad***, Misassaugua, Ontario, Canada.
- Les lipoprotéines du plasma sanguin humain VLDL, LDL et HDL ont été achetées de ***Sigma Chemicals***, St-Louis, É-U.
- Le spectromètre de RMN ^1H (modèle Bruker) dont la fréquence de résonance des noyaux d'hydrogène est fixée à 400 MHz, a été fourni par le ***Département de Chimie de l'Université de Montréal***, Montréal, Québec, Canada.

2.2. MÉTHODOLOGIE

2.2.1. Étude préliminaire des interactions ADN-liposomes cationiques

2.2.1.1. Préparation des liposomes

Le dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), le dioléoyltriméthylammonium propane (DOTAP) et distéroylphosphatidyléthanolaminoyl poly(éthylène) glycol (DSPE-PEG M_n = 2000 ou 5000), ont été mélangés dans une solution chloroformique anhydre dans des rapports de masse appropriés (DOPE:DOTAP 1:1, DOPE:DOTAP 1:1 contenant initialement 10 mol % de DSPE-PEG₂₀₀₀, 10 mol % de DSPE-PEG₅₀₀₀ ou 10 mol% de CHOL-PEG₉₀₀ et séchés par évaporation-rotatoire dans des ballons de verre à 73°C. Les liposomes ont été obtenus par hydratation d'un mince film de lipides dans un tampon de phosphate de sodium (10 mM de tampon phosphate de sodium contenant 0.85% de NaCl, pH 7.4) à 25°C pendant 30 minutes, suivi d'une agitation vigoureuse à 73°C pendant 60 secondes. Les diamètres des liposomes ont été réduits dans un bain à sonication (45 W) à 25°C, pendant 30-45 minutes.

2.2.1.2. Interactions ADN-liposomes cationiques

Des incubations de liposomes cationiques DOPE:DOTAP et de l'ADN génomique de sperme de saumon ont été effectuées à une température de 25°C, pendant 30 minutes à des rapports de masse DOPE:DOTAP-ADN de 1:1, 1:2, 2:1, 5:1, 10:1 ou de 15:1, de façon à déterminer le rapport minimal de neutralisation de l'ADN. Les diamètres des liposomes ou des complexes liposomes-ADN ont été déterminés par spectroscopie de corrélation de photons avec un Coulter 4N à un angle de 90° et une température de 23°C. Les potentiels ζ ont été déterminés par dispersion électrophorétique de Doppler dans un Coulter DELSA 440SX à une température de 23°C. Les standards appropriés ont été utilisés pour calibrer les instruments mis à notre disposition. De plus, les interactions entre les liposomes cationiques DOPE:DOTAP (auxquels ont été initialement incorporés à la surface, 10 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀, 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀ ou 10 mol% de CHOL-PEG₉₀₀) et l'ADN génomique de sperme de saumon, ont été réalisées à 23°C

pendant 30 minutes, à des rapports de masse ADN-DOPE:DOTAP de 1:1 à 1:10. La quantité d'ADN complexée à ces liposomes cationiques "pegylés" a été déterminée par analyse spectrofluorimétrique de la réaction entre l'ADN non-incorporé et le BrEt (concentration finale de 5 µg/ml). Le BrEt a été utilisé comme marqueur fluorescent à cause de la capacité de cette petite molécule (PM=394) chargée positivement, de s'insérer aisément entre les paires de base de l'ADN, et d'émettre un signal de fluorescence à une longueur d'onde de 620 nm, lorsqu'elle est excitée à une longueur d'onde de 525 nm. De plus, la charge positive du BrEt ne va pas interagir avec les liposomes cationiques DOPE:DOTAP.

2.2.2. Influence du chauffage sur l'incorporation des acides nucléiques dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP (méthode directe)

Des expériences d'analyse spectrofluorimétrique ont été réalisées en exposant l'ADN génomique (25 µg/ml), le plasmide pBR322 (25 µg/ml) ou l'ARN de levure (25 µg/ml), à différentes concentrations de liposomes cationiques DOPE:DOTAP (125 µg/ml ou 250 µg/ml), auxquels ont été incorporés initialement 10 mol% de CHOL-PEG₉₀₀, 10 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀. Ces préparations ont été incubées à 22°C, 60°C et 85°C pendant 30 minutes, suivi de l'analyse spectrofluorimétrique. La fluorescence de la réaction entre l'ADN génomique et le BrEt (concentration finale du marqueur de 5 µg/ml) a été mesurée à des longueurs d'onde d'excitation de 525 nm et d'émission de 620 nm. La fluorescence de la réaction entre l'ARN de levure et l'orange d'acridine (concentration finale du marqueur de 5 µg/ml) a été mesurée à des longueurs d'onde d'excitation de 525 nm et d'émission de 560 nm. Les quantités d'acides nucléiques incorporées dans les différentes formulations liposomiques considérées, ont été déterminées en établissant des courbes de calibration de l'ADN génomique de sperme de saumon ou de l'ARN de levure maintenus à 22°C ou chauffés à 60°C et 85°C pendant 30 minutes.

Il est à noter que l'échantillon témoin (=blanc) renferme les liposomes et le BrEt sans aucune trace d'ADN et génère une fluorescence nulle. Cependant, l'échantillon standard contient uniquement l'ADN et le BrEt, ce standard a permis de tirer la mesure de

fluorescence optimale pour les concentrations d'ADN et de BrEt utilisées. Ainsi, en comparant les mesures de fluorescence obtenues pour un échantillon d'ADN et de liposomes donné, à la mesure de fluorescence du standard, la quantité d'ADN incorporée dans ces liposomes a pu être directement déduite. Par la suite, pour s'assurer que l'ADN est bien incorporé dans ces liposomes et non pas fixé à la surface des liposomes, les mesures de potentiel ζ des complexes ADN-liposomes cationiques, ont été comparées à celles obtenues avec les liposomes cationiques, en s'assurant qu'il n'y ait pas eu de changement significatif.

2.2.2.1. Linéarisation, purification et intégrité du plasmide pBR322

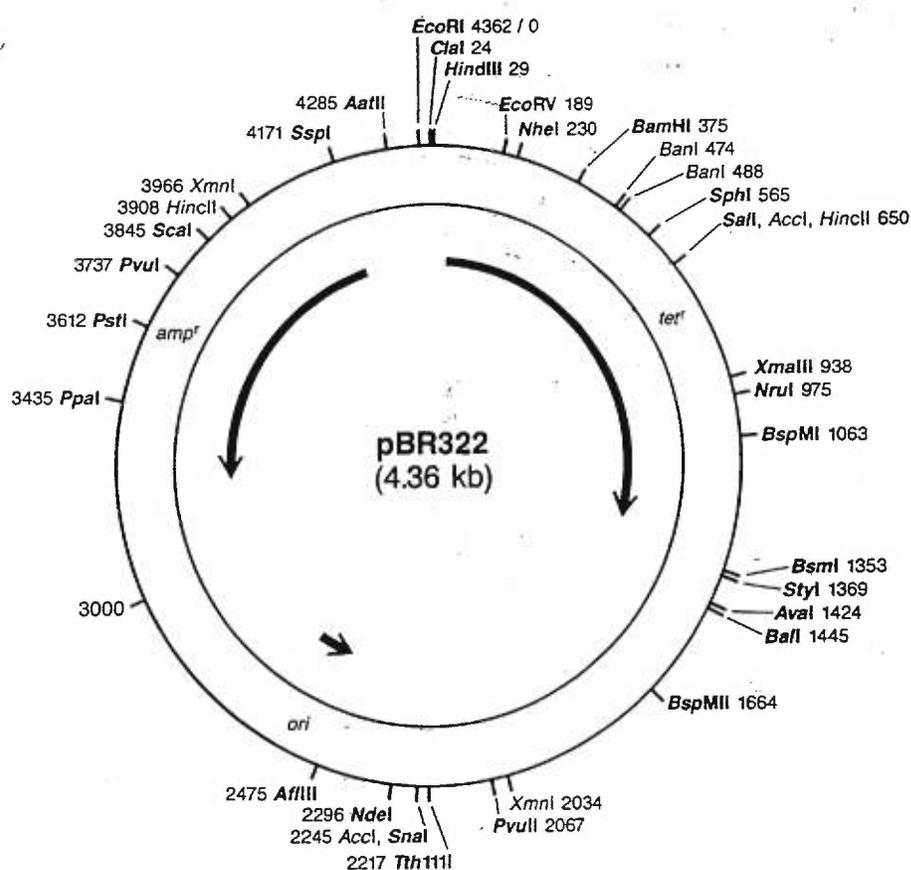


Schéma du plasmide pBR322

Bam HI, une enzyme de restriction isolée d'une souche *Bacillus amylifaciens* H, reconnaît et clive la séquence 5' G↓GATCC 3' à brin complémentaire 3' CCTAG↑G 5', du plasmide pBR322 au site 375. Ainsi, le plasmide pBR322 (25 µg) a été coupé avec l'enzyme de restriction Bam HI (25 unités) après 60 minutes d'incubation à 37°C. Afin d'optimiser les conditions d'incorporation de 25 µg/ml de plasmide pBR322 linéarisé dans 250 µg/ml de liposomes DOPE:DOTAP ou DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀, le plasmide pBR322 linéarisé a été purifié 2 fois par extraction avec le phénol-chloroforme, par précipitation avec l'acétate de sodium (0.3 mM à pH 5.2) et l'éthanol, suivi de plusieurs lavages à l'éthanol 70%. Le plasmide pBR322 a par la suite été resuspendu dans 30 µl de tampon TE (10 mM Tris HCl, pH 8.0 et 1 mM de EDTA, pH 8.0) [202]. Le plasmide pBR322 libre ou incorporé par chauffage à 85°C dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP ou DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀, a été incubé en présence de 80 unités de DNase I et le mélange réactionnel (400 µl) a été incubé à 37°C pendant 60 minutes. Le plasmide pBR322 a ensuite été isolé des liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non, extrait avec le phénol-chloroforme, précipité 2 fois en présence d'éthanol et de l'acétate de sodium (0.3 mM à pH 5.2), et resuspendu dans 30 µl de tampon TE (10 mM Tris Cl, pH 8.0 et 1 mM de EDTA, pH 8.0). L'intégrité du plasmide pBR322 linéarisé a été examinée par électrophorèse dans 0.7% de gel d'agarose dénaturant, contenant 5 µg/ml de BrEt.

2.2.3. Effets des variations de température sur l'incorporation du plasmide pBR322 dans les liposomes cationiques (méthode indirecte)

Le chauffage des complexes pBR322-DOPE:DOTAP, (auxquels ont été incorporés initialement 10 mol% de de CHOL-PEG₉₀₀, 10 mol% de DSPE:PEG₂₀₀₀ ou 10 mol% de DSPE:PEG₅₀₀₀), a été réalisé à des températures de 37°C, 50°C, 65°C, 70°C, 75°C et 85°C, pendant 30 minutes. Les complexes pBR322-DOPE:DOTAP ont ensuite été incubés avec 80 unités de DNase I, à 37°C pendant 60 minutes afin de se débarrasser de l'ADN non-incorporé. Par la suite, la DNase I a été inactivée à 85°C, pendant 5 minutes et le désoxycholate de sodium (concentration finale de 10 mM) a été incubé à 23°C, pendant 30 minutes avec chacune des préparations liposomiques afin de solubiliser les

PL. Les quantités de plasmide pBR322 incorporées dans les liposomes cationiques ont été déterminées par analyse spectrofluorimétrique avec le BrEt (concentration finale de 5 µg/ml).

2.2.4. Effet du chauffage sur l'expression de l'ADN liposomal dans les bactéries *E. coli*

2.2.4.1. Courbe de croissance des bactéries *E. coli*

Dix µl de bactéries *E. coli* Sure congelées (6×10^6 cellules), une lignée dérivée de *E. coli*, ont été incubées avec agitation dans des tubes de polystyrène stériles de 15 ml contenant 5 ml du milieu de culture LB (riche en tryptones, peptones, peptides et extrait de levure), dans un incubateur humide à 37°C pendant 24 heures. Une colonie de bactéries *E. coli* a été prélevée et déposée sur une plaque de pétris contenant le milieu de culture LB et de l'agar-agar à 37°C dans un incubateur à sec, pendant 16 heures. Les bactéries ont ensuite été placées dans des tubes stériles de polystyrène, et déposées sur glace (0°C) pendant 5-10 minutes, centrifugées à 1600g pendant 7 minutes à 4°C. Les culots ainsi obtenus ont été resuspendus dans 10 ml de 0.01 mM du CaCl₂ froid. Une seconde centrifugation à 1100g pendant 7 minutes a été réalisée à 4°C, suivi de la suspension de chaque culot dans 2 ml de CaCl₂ froid. Les cellules (250 µl) ont par la suite été placées dans des tubes stériles de polystyrène, préalablement refroidis et conservés immédiatement à -20°C. Dix µl de bactéries (5×10^6 cellules) ont été prélevées et incubées dans 1 ml de milieu LB pendant 1-5 heures. Les densités optiques des mélanges de bactéries compétentes ont été prises à 590 nm, suite à l'ajout des antibiotiques (concentrations finales de 0.1 µg/ml d'ampicilline et de 0.036 µg/ml de tétracycline). Il convient de mentionner que l'on emploie l'expression de "bactéries compétentes" pour signifier que la paroi des bactéries a été affaiblie par l'action de la solution saline tamponnée de CaCl₂ et que les bactéries sont désormais dans un état propice à subir un choc de chaleur et à être transformées par un plasmide.

2.2.4.2. Étude de la stabilité des liposomes cationiques dans le milieu de croissance des bactéries *E. coli*

Les liposomes cationiques DOPE:DOTAP (10 $\mu\text{mol/ml}$) ont été incubés à 37°C pendant 60 minutes dans 1 ml de milieu LB. Les diamètres et les potentiels ζ des liposomes cationiques DOPE:DOTAP (auxquels ont été incorporés initialement 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀), ont été mesurés par spectroscopie de corrélation de photons avec un Coulter 4N à un angle de 90° et par dispersion électrophorétique de Doppler avec un Coulter DELSA 440SX.

2.2.4.3. Insertion du plasmide pBR322 ou des complexes pBR322-liposomes cationiques dans les bactéries *E. coli*

Afin de vérifier l'effet du chauffage sur l'activité du plasmide pBR322 sous sa forme circulaire ou linéaire dans les cellules *E. coli*, le plasmide pBR322 (25 $\mu\text{g/ml}$) a été incorporé par chauffage à 85°C dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non (10 $\mu\text{mol/ml}$). Le plasmide a ensuite été purifié par extraction avec le phénol-chloroforme, précipité avec l'acétate de sodium et l'éthanol et incubé pendant 10 minutes à 0°C avec 100 μl de bactéries *E. coli* (soient 5.4×10^6 bactéries).

Les complexes pBR322-DOPE:DOTAP (préalablement formés par chauffage à 85°C de 1.25 $\mu\text{mol/ml}$, 2.5 $\mu\text{mol/ml}$, ou 5 $\mu\text{mol/ml}$ de liposomes et d'une concentration fixe de 25 $\mu\text{g/ml}$ de plasmide pBR322), ont été ajoutés à 100 μl de bactéries *E. coli* compétentes (soient 5.4×10^6 bactéries) et incubés pendant 10 minutes à 0°C.

De plus, cent μl de bactéries *E. coli* (5.4×10^6 bactéries) ont été incubées dans des tubes de 15 ml de polystyrène stériles pendant 10 minutes à 0°C, avec les complexes pBR322-DOPE:DOTAP (préalablement formés par chauffage à 85°C de 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 0.4 $\mu\text{g/ml}$, 0.8 $\mu\text{g/ml}$, 1.6 $\mu\text{g/ml}$, 3.1 $\mu\text{g/ml}$, 6.3 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ ou de 25 $\mu\text{g/ml}$ de plasmide pBR322 incorporés dans 10 $\mu\text{mol/ml}$ de liposomes cationiques DOPE:DOTAP).

Finalelement les bactéries *E. coli* (5.4×10^6 bactéries) exposées au plasmide pBR322 libre ou liposomal, ont subi un choc de chaleur en plaçant les tubes à 42°C pendant 2 minutes. Un ml de TPS a été ajouté à chaque tube incubé avec agitation, à 37°C pendant 1 heure. Dix µl de chacun des mélanges a été prélevé et incubé avec agitation à 37°C pendant 5 heures, dans 1 ml de milieu de culture LB (riche en tryptones, peptones, peptides et extrait de levure). Les densités optiques des mélanges ont été mesurées par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 590 nm immédiatement après l'ajout d'antibiotiques (concentrations finales de 0.1 µg/ml d'ampicilline et de 0.036 µg/ml de tétracycline).

Le plasmide pBR322 (double brin d'ADN circulaire de 4363 pB), possède notamment deux sites de restriction se trouvant dans les gènes, conférant à la bactérie l'expression d'une résistance à l'ampicilline et l'expression d'une résistance à la tétracycline. L'activité du plasmide pBR322 sera évaluée en comparant les absorbances à 590 nm obtenues après l'incubation du plasmide dans les bactéries *E. coli* en présence des antibiotiques ampicilline et tétracycline, par rapport aux absorbances obtenues pour les bactéries exposées à ces antibiotiques sans plasmide.

2.2.5. Transfection du plasmide pSV-β-Gal dans les cellules Cos-7 (influence des conditions expérimentales)

2.2.5.1. Courbes de dosage du plasmide pSV-β-Gal

Le plasmide pSV-β-Gal a été introduit dans les cellules Cos-7 par la méthode de précipitation au phosphate de calcium [202]. Des concentrations finales de plasmide pSV-β-Ga de 0.03 µg/ml, 0.06 µg/ml, 0.09 µg/ml, 0.12 µg/ml, 0.2 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml ou de 5 µg/ml, chauffées à 37°C, 50°C, 65°C et 85°C pendant 30 minutes ont été ajoutées aux cellules adhérentes à 40-50% de confluence et incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ pendant 4 heures dans le milieu Dulbecco (DMEM). Des concentrations finales de plasmide pSV-β-Gal de 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 25 µg/ml et 50 µg/ml, chauffées à 37°C pendant 30 minutes, ont également été incubées avec les cellules adhérentes à 40-50% de

confluence, pendant 4 heures dans le DMEM. Après l'incubation, le DMEM a été remplacé par du DMEM contenant 10% de sérum de veau (DMEM-FCS), et les cellules Cos-7 ont ensuite été incubées pour une période totale de 48 heures, avant l'analyse spectrophotométrique de l'activité de la β -Galactosidase.

2.2.5.2. Influence de l'insertion du DSPE-PEG₅₀₀₀ à la surface des liposomes DOPE:DOTAP sur les propriétés des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP

Cinq μ g de plasmide pSV- β -Gal ont été ajoutés à 50 μ g de liposomes cationiques DOPE:DOTAP et incubés à 37°C pendant 30 minutes dans 4 ml de HBSS. Les complexes ont été centrifugés à 13,000g à 25°C, pendant 30 minutes afin de se débarrasser de l'ADN non-incorporé. Les culots ont par la suite été resuspendus dans 4 ml de DMEM.

Le mélange pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP a été divisé en deux:

- pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP a été maintenu à 25°C pendant 60 minutes.
- pSV- β -Gal DOPE:DOTAP auxquels ont été insérés initialement 10 mol % de micelles de DSPE-PEG₂₀₀₀ et laissée incuber à 25°C pendant 60 minutes.

Ces micelles de DSPE-PEG₂₀₀₀ ont été préparés en dissolvant des quantités variables de PEG dans 10 mM de tampon phosphate de sodium contenant 0.85% de NaCl, pH 7.4 (TPS). Le réactif de Bradford a permis de doser le DSPE:PEG₂₀₀₀. Le réactif de Bradford a la particularité de réagir avec les liaisons peptidiques des protéines et les liaisons carbamates des chaînes de DSPE-PEG₂₀₀₀, se traduisant par l'apparition d'une couleur bleue détectée à une densité optique de 595 nm.

Les diamètres et potentiels ζ ont été déterminés par prélèvement de 100 μ l des mélanges initiaux, dilués dans un volume total de 2 ml de TPS.

La quantité d'ADN incorporée dans les liposomes DOPE:DOTAP a été déterminée suite à:

- L'ajout de 10 mM de SDS à chaque échantillon, incubé à 25°C pendant 30 minutes, afin d'assurer la dissolution de la membrane liposomique des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP.
- L'analyse spectrofluorimétrique de la réaction entre le plasmide pSV- β -Gal et le BrEt, effectuée à des longueurs d'onde d'excitation de 525 nm et d'émission de 620 nm.

2.2.5.3. Culture cellulaire et transfections

L'influence du temps de pré-incubation des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP "pegylés" ou non, ainsi que l'influence de la composition du milieu de pré-incubation, sur l'activité de transfection de ces complexes dans les cellules Cos-7 ont été évaluées.

Les cellules Cos-7 ont été maintenues dans le DMEM-FCS contenant 500 μ g de sulfate de gentamycine par 100 ml de DMEM-FCS à 37°C, dans une atmosphère humide contenant 5-10 % de CO₂. À confluence, 100 μ l de cellules Cos-7 (5×10^5 cellules/puit) ont été trypsinisées, placées dans des microplaques de 96 mm, et incubées à 37°C pendant 24 heures dans 100 μ l de DMEM-FCS. Les cellules adhérentes à confluence de 70-80% ont ensuite été lavées avec 200 μ l de HBSS. Cinq μ g de plasmide pSV- β -Gal ont été incubés à 23°C pendant 30 minutes avec 50 μ g de liposomes DOPE:DOTAP, auxquels ont été insérés initialement 10 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀. Les cellules ont d'abord été pré-incubées avec les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP, pendant différentes périodes de temps (de 0 à 6 heures) dans le DMEM, le milieu de culture a ensuite été aspiré et remplacé par 200 μ l de DMEM-FCS. Les cellules ont par la suite été incubées à 37°C pour une période additionnelle de 48 heures dans une atmosphère humide contenant 5-10% de CO₂, en vue de déterminer l'expression de la β -Galactosidase. Les mêmes étapes de transfection et de détermination de l'activité de la β -Galactosidase ont été répétées, sauf que les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP ont

été pré-incubés avec les cellules Cos-7 pendant 4 heures ou 24 heures, dans le DMEM ou dans le DMEM-FCS.

2.2.5.4. Détection de l'activité de la β -Galactosidase

Les cellules exprimant la β -Galactosidase endogène ont été visualisées par coloration avec le substrat β -bromo-4-chloro-3-indoyl- β -galactopyranoside (X-gal) [203]. L'expression de la β -Galactosidase a été estimée par comptage des cellules bleues dans 3 régions aléatoires du centre des microplaques de 96 mm, et exprimée comme un pourcentage du total des cellules Cos-7, soit environ 20%. Après 48 heures d'incubation, le milieu de culture a été décanté et 50 μ l de tampon lyse (0.1% de Triton X-100, 250 mM de Tris pH 8.0) ont été ajoutés à chaque puits. Les microplaques ont été maintenues à -70°C , pendant 2 heures et ramenées à température ambiante. Une concentration finale de 1 mg/ml du substrat *ortho*-nitrophényle- β -D-galactoside (ONPG), a été préparée dans un tampon (contenant 60 mM de phosphate de sodium dibasique $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à pH 7.5, 1 mM de MgSO_4 , 10 mM de KCl, 55 mM de β -mercaptoéthanol) et 150 μ l de substrat ont été ajoutés à chaque puits de chaque microplaque pendant 45 minutes. Cinquante μ l de 1 M Na_2CO_3 ont été ajoutés pour l'arrêt de la réaction. L'absorbance des échantillons des microplaques a été lue à 492 nm, après apparition de la couleur jaune (indice de l'ampleur de la dégradation du substrat ONPG par la β -Galactosidase).

2.2.5.5. Toxicité des liposomes cationiques dans les cellules Cos-7

La toxicité des liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non (1.25 μ g, 2.5 μ g, 5 μ g, 25 μ g, 50 μ g) a été déterminée par un test colorimétrique de détection de la libération de l'enzyme cytosolique lactate déshydrogénase (LDH), après 48 heures d'incubation de ces liposomes. La LDH est responsable de la conversion réversible de l'acide pyruvique en présence de NADH en acide lactique et NAD^+ . Un ml de la solution de 0.1% de substrat pyruvate a été incubé à 37°C pendant 5 minutes. Vingt μ l de la solution de substrat pyruvate ont été prélevés et incubés avec 4 μ l de milieu cellulaire à 37°C pendant 30 minutes. Vingt μ l de 2,4-Dinitrophénylhydrazine (réactif colorant) ont été incubés avec le milieu cellulaire à 23°C pendant 30 minutes. Par la suite, la réaction est arrêtée avec une solution fraîchement préparée de NaOH 0.4 N, incubée à 23°C

pendant 5 minutes avec le milieu cellulaire, avant la détermination de la densité optique à 490 nm.

La détermination de la toxicité des liposomes cationiques DOPE:DOTAP dans les cellules Cos-7 a été basée sur le principe que lorsque les cellules sont vivantes, le pyruvate présent dans le milieu cellulaire réagit avec le 2,4-Dinitrophénylhydrazine et génère une couleur pourpre, détectable à 490 nm. Par contre, la mort des cellules est accompagnée de la libération de la LDH. L'enzyme métabolise le pyruvate et ce dernier ne peut plus réagir avec le 2,4-Dinitrophénylhydrazine.

2.2.6. Effet de certains constituants biologiques sur la stabilité des liposomes cationiques

Pour toutes ces études, l'influence des constituants biologiques (sérum de veau, SDS, lipoprotéines du plasma sanguin humain et composants du milieu synovial) sur la stabilité des porteurs liposomaux d'ADN, a été déterminée en évaluant :

- Les changements de diamètre (agrégation) et de potentiels ζ des liposomes cationiques.
- La séparation des liposomes DOPE:DOTAP (auxquels ont été incorporés initialement 10 mol %, 25 mol % ou 50 mol % de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de DSPE-PEG₅₀₀₀) de leurs micelles de DSPE-PEG par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de Sépharose 2B. La détection des liposomes et de leurs micelles a été effectuée en mesurant la densité optique à 595 nm avec le réactif de Bradford (Bleu de Coumassi) pour chacune des fractions collectées. Le réactif de Bradford a la particularité de réagir avec les liaisons peptidiques des protéines et les liaisons carbamates des chaînes de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de DSPE-PEG₅₀₀₀, se traduisant par l'apparition d'une couleur bleue détectée à une densité optique de 595 nm.
- La rétention de l'ADN plasmidique dans les liposomes DOPE:DOTAP "pegylés" ou non, déterminée par analyse spectrofluorimétrique avec le BrEt (concentration finale de 5 µg/ml).

Ainsi, les particularités des méthodes utilisées pour l'évaluation des effets de chaque constituant biologique sur la stabilité des porteurs liposomaux d'ADN seront données.

2.2.6.1. Sérum de veau

Dix mol%, 25 mol% ou 50 mol % de DSPE-PEG₂₀₀₀ ont initialement été incorporés dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP (250 µg/ml). Ces liposomes ont été incubés à 37°C pendant 4 heures dans 1 ml de DMEM-FCS. Il est à noter que les mesures de potentiel ζ obtenues, sont en fait celles d'un mélange de liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ et de micelles de DSPE-PEG₂₀₀₀.

Ces mêmes expériences ont été répétées, mais cette fois-ci en ajoutant initialement 50 µg de plasmide pSV- β -Gal à 500 µg de liposomes DOPE:DOTAP, incubés à 37°C pendant 30 minutes. Par la suite, 10 mol%, 25 mol % ou 50 mol % de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou DSPE-PEG₅₀₀₀ ont été ajoutés aux complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP. Les complexes ont été incubés pendant 60 minutes, à 23°C.

L'influence de la température d'entreposage des différentes fractions de complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ ou pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ collectés a été analysée. Un ml de la fraction ayant la plus haute absorbance avec le réactif de Bradford a été conservée à -20°C (en présence ou non de 5% de dextrose), à 4°C, 22°C ou à 37°C pendant 2 mois.

2.2.6.2. Spectroscopie en RMN ¹H

Suite à la séparation des liposomes cationiques DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ ou DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ de leurs micelles par perméation de gel sur colonne de Sépharose 2B et à leur extraction, les fractions de DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ ou DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ ont été analysées par RMN ¹H afin d'estimer la quantité de DSPE-PEG présente à la surface de ces liposomes cationiques. L'extraction des lipides a été effectuée selon les étapes suivantes:

La phase organique contenant les lipides dissouts dans le chloroforme (CHCl_3) a été extraite et mélangée avec le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) pour enlever l'excès d'eau. La solution a été décantée sous vide et les lipides ont été récupérés dans un ballon jaugé.

L'évaporation-rotative des lipides a été effectuée à 73°C jusqu'à l'obtention d'un mince film de lipides. Par la suite, le film de lipides a été hydraté avec 1.4 ml de chloroforme deutéré (CDCl_3). Le mélange a été transféré dans un tube de verre cylindrique et analysé en RMN ^1H dans un spectromètre de type Bruker de 400 MHz. Les études en RMN ^1H ont été réalisées afin de résoudre le problème d'interaction de DOTAP avec le réactif de Bradford.

La position des pics en RMN ^1H est contrôlée par le blindage ou le déblindage électronique du noyau. La densité électronique accrue des liaisons des liposomes DOPE:DOTAP par rapport à celle des dérivés de DSPE-PEG, se traduit par l'apparition de pics en RMN ^1H ayant un déplacement chimique d'environ 1.30 ppm, comparé à un déplacement chimique d'environ 3.65 ppm pour les dérivés de DSPE-PEG.

Ainsi, la quantité de dérivés de DSPE-PEG insérées à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP a été déterminée d'abord en établissant les rapports des mesures des hauteurs des pics du spectre RMN ^1H associées aux déplacements chimiques respectifs des liposomes DOPE:DOTAP et des dérivés de DSPE-PEG. Par la suite, les valeurs des rapports obtenues ont été portées sur les courbes de calibration correspondantes afin de déduire la quantité de DSPE-PEG insérée à la surface des liposomes DOPE:DOTAP.

2.2.6.3. Déoxycholate de sodium (SDS)

Le plasmide pSV- β -Gal (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a été incubé à 37°C pendant 60 minutes avec les liposomes DOPE:DOTAP (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$), auxquels ont été incorporés initialement 10 mol %, 25 mol % ou 50 mol % de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de DSPE-PEG₅₀₀₀. L'ADN non-incorporé a par la suite été éliminé par centrifugation à 13,000g à 23°C pendant 30 minutes.

2.2.6.4. Lipoprotéines humaines

Les liposomes cationiques DOPE:DOTAP (250 µg/ml), auxquels ont été incorporés initialement 50 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀, ont été incubés avec 50 µg/ml de plasmide pSV-β-Gal à 37°C pendant 30 minutes. Afin de se débarrasser de l'ADN non-incorporé, les complexes pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP ont été incubés à 37°C pendant 60 minutes avec 100 unités de DNase I, suivi de l'inactivation de l'enzyme à 85°C, pendant 5 minutes.

Le plasmide pSV-β-Gal (50 µg/ml) a été incorporé dans 250 µg/ml de liposomes anioniques de DOPE:DMPG par une technique de déshydratation et hydratation [154]. Dix µmol par ml de DOPE:DMPG (rapport de masse 9:1) ont été microfluidisées dans un microfluidiseur à une pression de 13,000 psi à 60°C, pour 3 cycles pendant 5 minutes, de façon à former des SUV. Le plasmide pSV-β-Gal (50 µg/ml) a été mélangé avec les SUV de DOPE:DMPG (250 µg/ml) et le mélange a été lyophilisé pendant 16 heures. La poudre récupérée a été hydratée avec un volume d'eau distillée (préalablement chauffée à 60°C), correspondant à 1/10 du volume total de SUV. La suspension formée de liposomes multilamellaires contenant l'ADN liposomal et d'ADN libre, a été incubée avec 100 unités de DNase I à 37°C pendant 60 minutes, suivi de l'inactivation de l'enzyme à 85°C, pendant 5 minutes. Le culot de liposomes a été lavé avec 8 ml de TPS, centrifugé et suspendu dans 1 ml de TPS. Le SDS (concentration finale de 10 mM) a été incubé à 25°C, pendant 30 minutes pour la dissolution de la membrane liposomale.

La rétention du plasmide pSV-β-Gal incorporé dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP ou dans les liposomes anioniques de DOPE:DMPG, ainsi que les changements de diamètre (agrégation) et de potentiel ζ liposomal, ont été mesurés suite à l'incubation à 37°C pendant 5 minutes des complexes pSV-β-Gal-liposomes avec une concentration finale physiologique de 500 µg/ml de chacune des lipoprotéines du plasma sanguin humain, HDL, LDL ou VLDL.

3. RÉSULTATS

3.1. Étude préliminaire des interactions acides nucléiques-liposomes cationiques

3.1.1. Caractérisation des liposomes cationiques DOPE:DOTAP

Tableau 2. Interaction à 23°C des liposomes cationiques DOPE:DOTAP avec l'ADN génomique de sperme de saumon.

<i>Formulations DOPE:DOTAP-ADN</i>		
Liposome: ADN*	Diamètre (nm)	Potentiel ζ (mV)
0	5516.6 \pm 293.3	-45.6 \pm 2.8
1:2	4766.4 \pm 200.8	-59.2 \pm 2.6
1:1	1203.1 \pm 88,3	+3.8 \pm 0.8
2:1	1679.0 \pm 55.2	+25.7 \pm 1.2
5:1	2530.1 \pm 88.2	+30.6 \pm 0.2
10:1	3206.1 \pm 111.8	+32.6 \pm 1.9
15:1	3905.1 \pm 189.1	+33.9 \pm 2.6

*En l'absence d'ADN, les liposomes cationiques DOPE:DOTAP ont un diamètre de 380 nm et un potentiel ζ de +34.5 mV. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

Les résultats du tableau 2 démontrent que le rapport de masse DOPE:DOTAP-ADN nécessaire pour assurer la neutralisation de l'ADN génomique de sperme de saumon est de 1:1. Le recouvrement de la charge initiale des liposomes cationiques DOPE:DOTAP s'effectue à un rapport de masse DOPE:DOTAP-ADN de 5:1. De plus, l'ajout des liposomes cationiques DOPE:DOTAP à l'ADN génomique de sperme de saumon engendre des mesures de diamètres inférieures à celles de l'ADN seul. Les variations observées dans les mesures de diamètres et de potentiel ζ des complexes DOPE:DOTAP-ADN, sont étroitement dépendantes des rapports DOPE:DOTAP-ADN considérés.

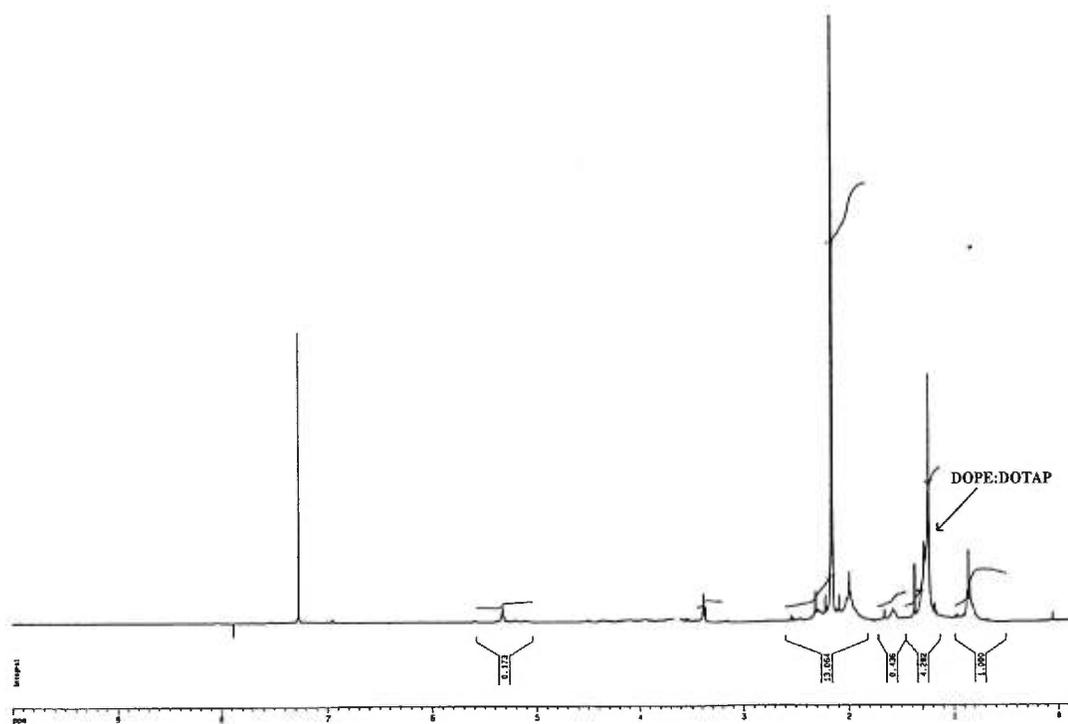


Figure 1a: Spectre en RMN ^1H des liposomes DOPE:DOTAP. La quantité de liposomes DOPE:DOTAP a été déterminée par RMN ^1H .

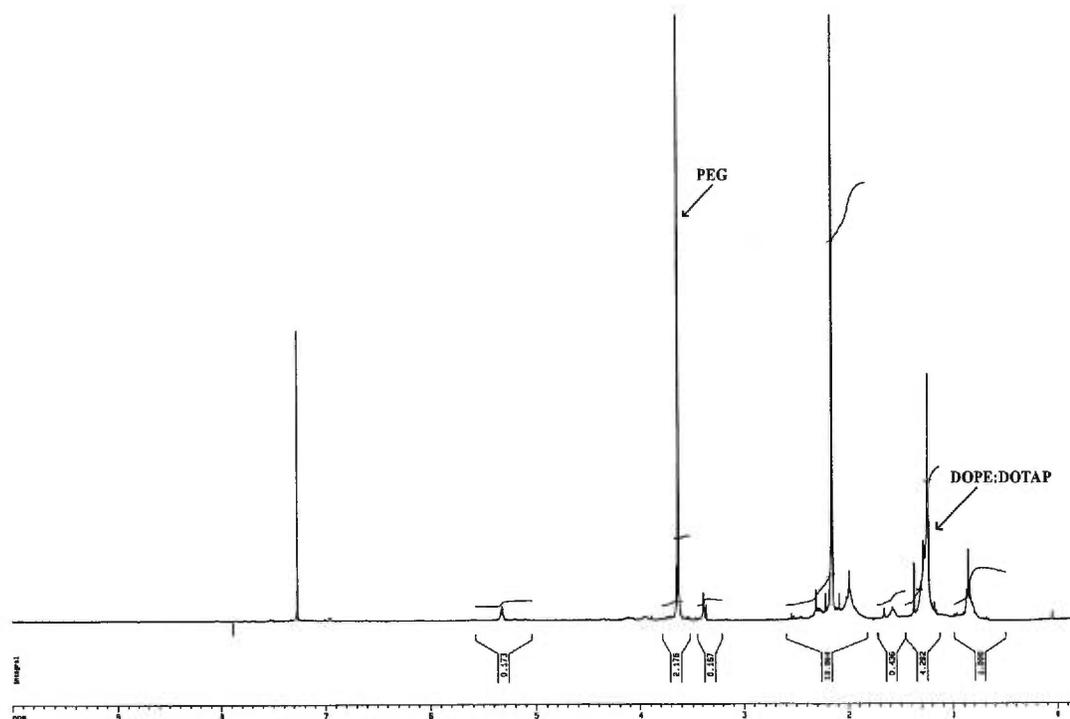


Figure 1b: Spectre en RMN ^1H des liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG $_{2000}$. Les liposomes DOPE:DOTAP (auxquels ont été incorporés initialement 50 mol % de DSPE-PEG $_{2000}$) ont été séparés de leurs micelles de DSPE-PEG $_{2000}$ par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de Sépharose 2B. La quantité de DSPE-PEG $_{2000}$ insérée à la surface des liposomes DOPE:DOTAP a été déterminée par RMN ^1H .

Les figures 1a et 1b indiquent que le pic des liposomes DOPE:DOTAP apparaît à environ 1.30 ppm et a une hauteur d'environ 4 cm. Le pic du DSPE-PEG $_{2000}$ apparaît à environ 3.65 ppm et a une hauteur d'environ 2.3 cm. Le rapport des mesures de hauteur des pics de PEG/chaîne de DOPE:DOTAP obtenu du spectre RMN ^1H associé aux déplacements chimiques respectifs des liposomes et des dérivés de DSPE-PEG, a permis la détermination du nombre de mol% de DSPE-PEG $_{2000}$ inséré à la surface des liposomes DOPE:DOTAP (se référer aux figures 2 et 3).

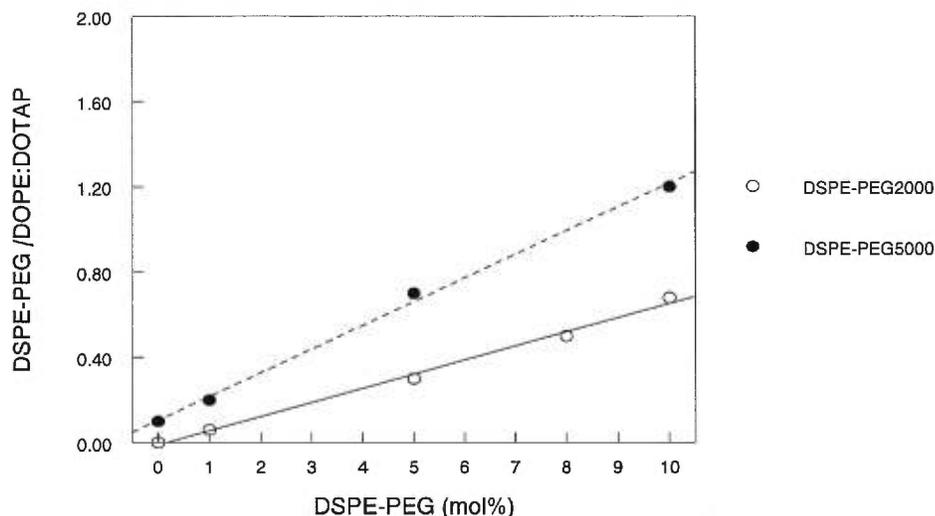


Figure 2. Courbes de calibration en RMN ^1H des liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG $_{2000}$ et DOPE:DOTAP:DSPE-PEG $_{5000}$.

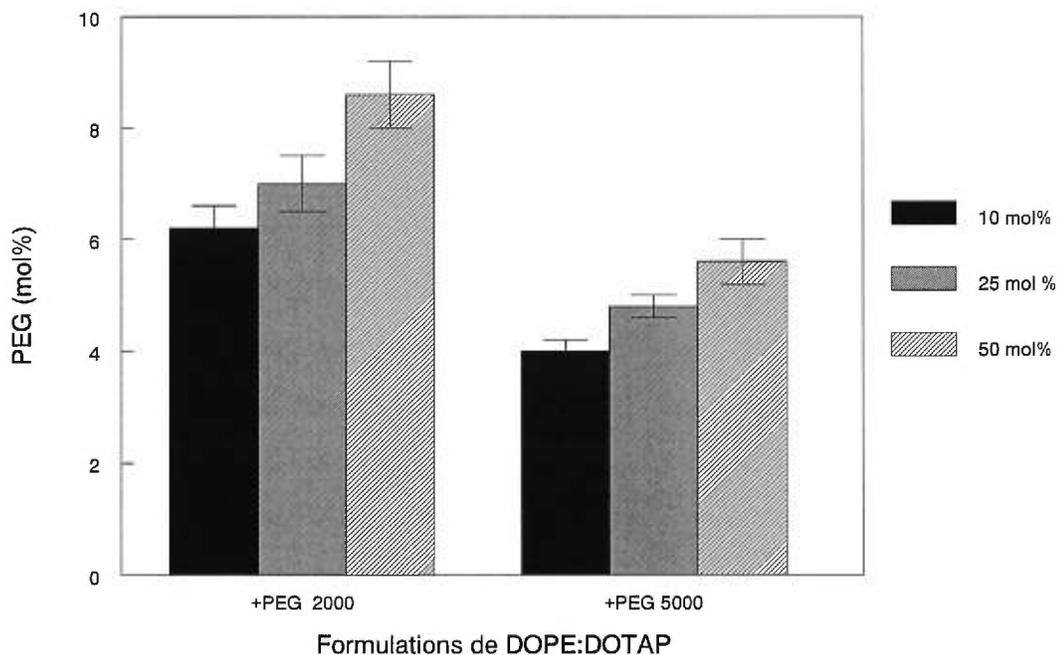


Figure 3: Quantités de DSPE-PEG insérées à la surface des liposomes DOPE:DOTAP, déterminées par RMN ^1H , après incubation avec 10 mol %, 25 mol % ou 50 mol % de DSPE-PEG $_{2000}$ ou de DSPE-PEG $_{5000}$. Les liposomes DOPE:DOTAP (auxquels ont été incorporés initialement 10 mol %, 25 mol % ou 50 mol % de DSPE-PEG $_{2000}$ ou de DSPE-PEG $_{5000}$) ont été séparés de leurs micelles de DSPE-PEG $_{2000}$ ou de DSPE-PEG $_{5000}$ par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de Sépharose 2B. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

La figure 3 illustre que l'ajout initial de 10 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀ à la surface des liposomes DOPE:DOTAP (en ayant séparé les micelles de PEG par chromatographie à filtration sur gel), n'assure en réalité que 6.2 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou 4 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀ insérées à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, déterminées par RMN ¹H. Une augmentation du nombre de mol% de PEG initialement incorporé à la surface des liposomes DOPE:DOTAP à 25 mol%, contribue à insérer environ 7 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou 4.8 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀ et après avoir incorporé initialement 50 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de DSPE-PEG₅₀₀₀ aux liposomes DOPE:DOTAP, 8.6 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ et 5.6 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀ ont été insérées à la surface de ces liposomes. À mesure que nous augmentons la concentration initiale de DSPE-PEG à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, la quantité de PEG insérée au sein des bicouches phospholipidiques s'élève, mais par rapport aux concentrations initialement incorporées de PEG, la quantité de PEG qui s'insère à la surface des liposomes DOPE:DOTAP est relativement faible. Il y a donc une saturation très rapide des sites d'insertion de DSPE-PEG, à la surface des liposomes DOPE:DOTAP. Environ 1.5 fois moins de DSPE-PEG₅₀₀₀ ont été insérés au sein des bicouches phospholipidiques des liposomes DOPE:DOTAP, comparée à la quantité de DSPE-PEG₂₀₀₀ insérée (figures 2 et 3).

3.1.2. Fluorescence de l'ADN génomique liposomal

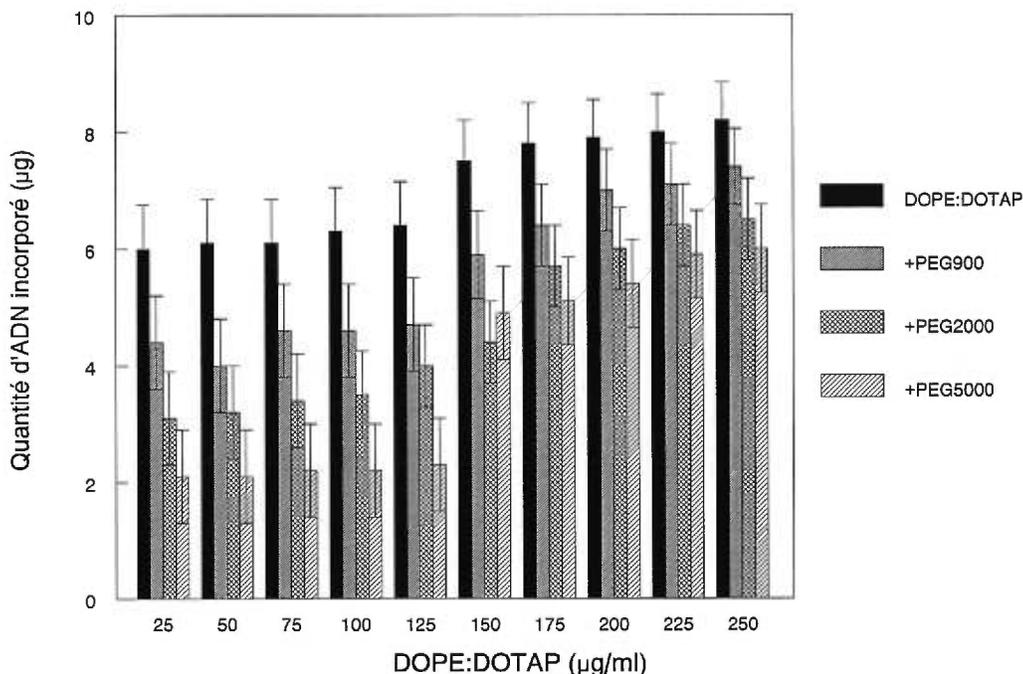


Figure 4: Effet des dérivés du PEG sur l'incorporation de l'ADN génomique de sperme de saumon dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP. Interaction à 23°C, pendant 30 minutes de 25 µg/ml d'ADN génomique de sperme de saumon avec différentes concentrations de liposomes cationiques DOPE:DOTAP auxquels ont été incorporés 10 mol% de dérivés de PEG. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

La figure 4 démontre que les propriétés de fluorescence révèlent être dépendantes des rapports de masse ADN-liposomes cationiques. Les mesures de fluorescence les plus élevées apparaissent à des concentrations de liposomes cationiques DOPE:DOTAP comprises entre 25 µg/ml et 125 µg/ml. Les quantités d'ADN incorporées dans les liposomes DOPE:DOTAP sont relativement constantes (environ 6 µg d'ADN pour les liposomes DOPE:DOTAP). Cependant, à des concentrations de liposomes DOPE:DOTAP supérieures à 125 µg/ml, des intensités de fluorescence plus faibles prédominent. Dans ce cas, environ 8 µg d'ADN sont incorporés dans ces liposomes.

3.1.3. Effet de PEG à la surface des liposomes cationiques

La figure 4 illustre que l'incorporation de 10 mol% de CHOL-PEG₉₀₀, de 10 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀, ou de 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀ à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, se traduit par une diminution significative de la quantité d'ADN incorporée dans ces liposomes, comparée à celle obtenue avec les complexes ADN-DOPE:DOTAP sans les dérivés du PEG. En effet, à un rapport de masse ADN:liposomes de 1:5, environ 7 µg d'ADN sont incorporés dans les liposomes DOPE:DOTAP, comparés à environ 2 µg d'ADN pour les liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀.

3.2. Influence du chauffage sur l'incorporation des acides nucléiques dans les liposomes cationiques

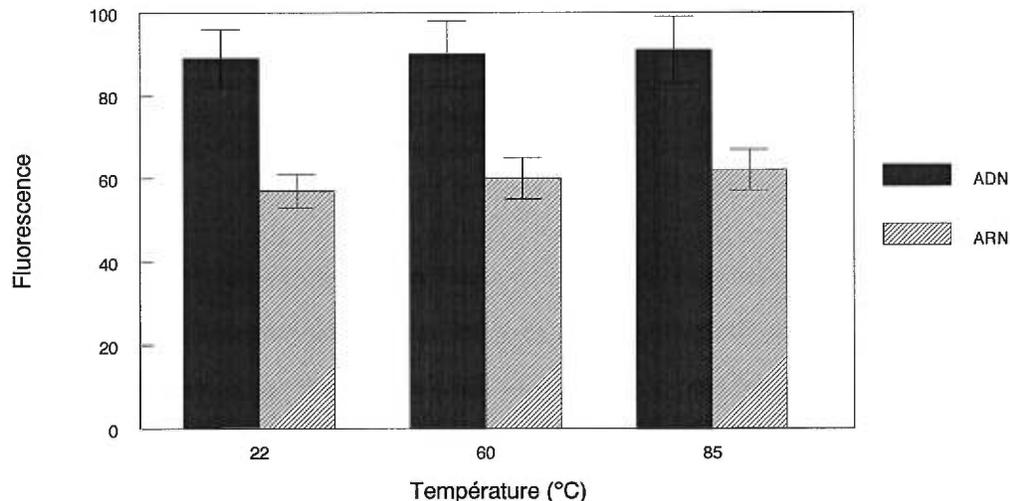


Figure 5: Courbes de calibration de l'ADN génomique de sperme de saumon et de l'ARN de levure. L'ADN génomique de sperme de saumon et l'ARN de levure (25 µg/ml) ont été chauffés pendant 30 minutes à 60°C et à 85°C. L'analyse spectrofluorimétrique de la réaction entre l'ADN et le BrEt et entre l'ARN et l'orange d'acridine. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

La figure 5 démontre que le chauffage de l'ADN génomique de sperme de saumon et de l'ARN de levure n'affecte pas significativement l'interaction de ces acides nucléiques avec le BrEt et l'orange d'acridine.

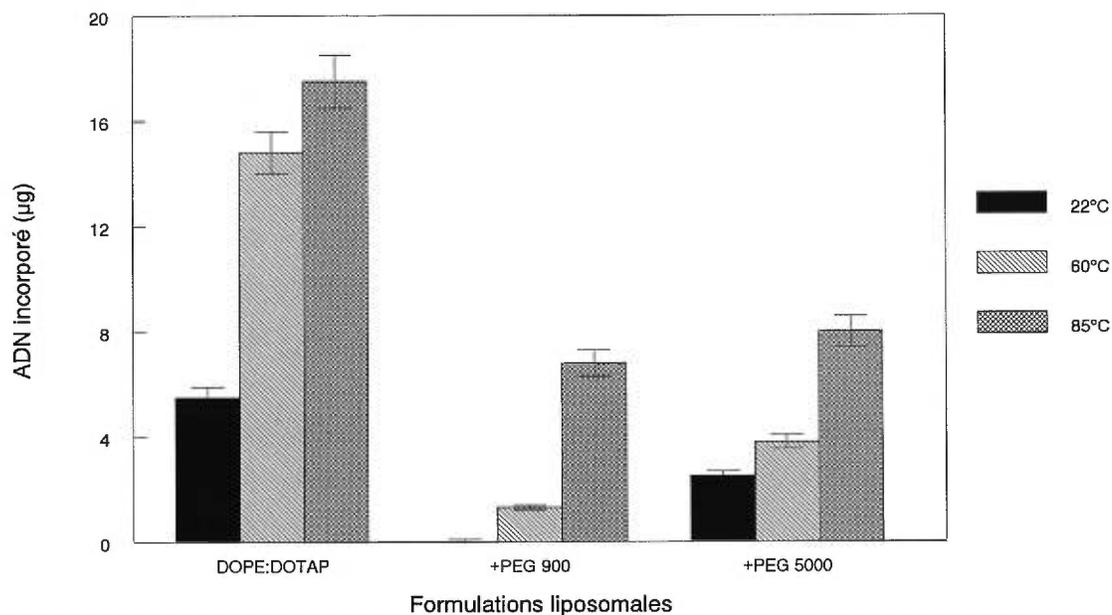


Figure 6: Effet du chauffage sur l'incorporation de l'ADN génomique de sperme de saumon dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non. Le CHOL-PEG₉₀₀ (10 mol%) ou le DSPE-PEG₅₀₀₀, (10 mol%) ont été incorporés dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP (250 µg/ml). L'ADN génomique de sperme de saumon (25 µg/ml) a été incorporé par chauffage à 60°C et à 85°C pendant 30 minutes. Les quantités d'ADN incorporées dans ces liposomes ont été déterminées par analyse spectrofluorimétrique avec le BrEt. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

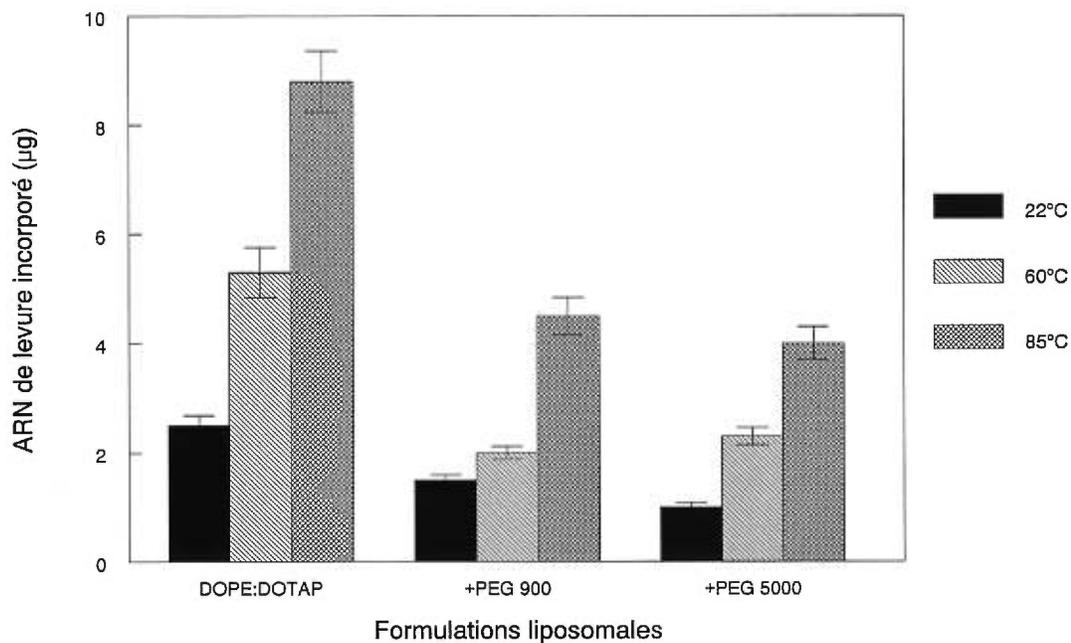


Figure 7: Influence du chauffage sur l'incorporation de l'ARN de levure dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

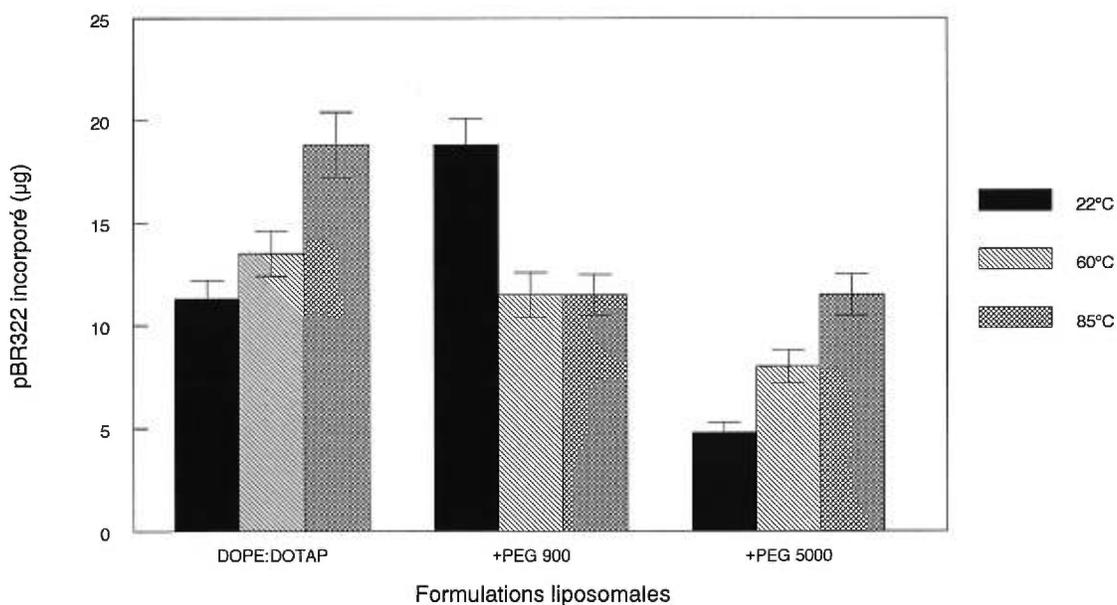


Figure 8: Influence du chauffage sur l'incorporation du plasmide pBR322 dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

Les figures 6-8 montrent que le chauffage des différentes préparations acides nucléiques-liposomes cationiques avec ou sans dérivés de PEG à 60°C ou à 85°C pendant 30 minutes, contribue à augmenter considérablement l'incorporation de l'ADN génomique de sperme de saumon, de l'ARN de levure et du plasmide pBR322 dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non. L'ADN génomique de sperme de saumon a été incorporé environ 2 fois plus dans les liposomes DOPE:DOTAP avec ou sans le PEG, que l'ARN de levure à 22°C. De plus, les incorporations du plasmide pBR322 dans les liposomes cationiques à des températures de chauffage de 60°C et 85°C, s'avèrent significativement plus élevées que celles obtenues avec l'ADN génomique ou l'ARN de levure (19 µg de plasmide pBR322 incorporés dans les liposomes DOPE:DOTAP, après chauffage à 85°C, comparé à 16 µg d'ADN génomique de sperme de saumon et 9 µg d'ARN de levure incorporés dans les liposomes DOPE:DOTAP). Avec le CHOL-PEG₉₀₀, l'augmentation de la température se traduit par une diminution de la quantité de plasmide incorporée dans les liposomes DOPE:DOTAP.

3.2.1. Sensibilité du plasmide pBR322 à la digestion par la DNase I

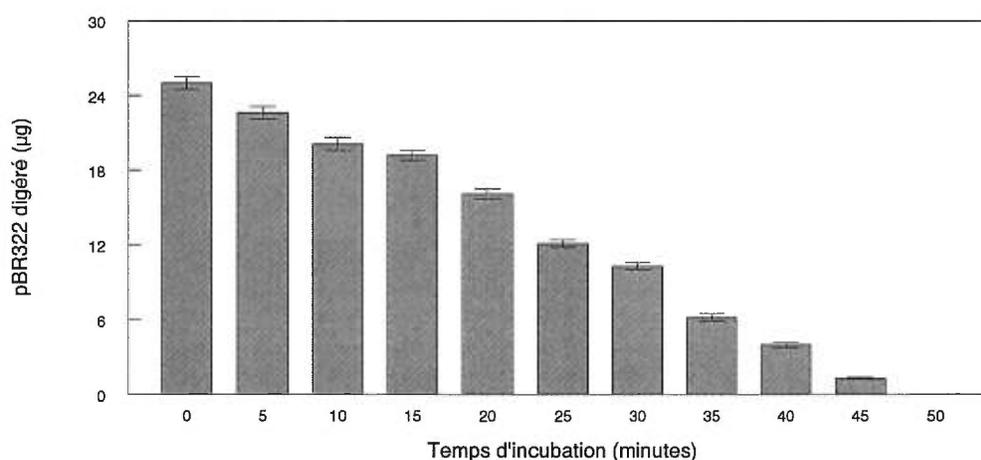


Figure 9: Susceptibilité du plasmide pBR322 à la digestion par la DNase I. Détermination de la quantité de plasmide pBR322 digérée, suite à l'exposition de 25 µg/ml de plasmide pBR322 avec 80 unités de DNase I, à 37°C pendant 50 minutes. Les quantités d'ADN digérées par l'enzyme ont été déterminées par analyse spectrofluorimétrique avec le BrEt. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

La figure 9 confirme que 50 minutes d'incubation à 37°C de 25 µg/ml de plasmide pBR322 avec 80 unités de DNase I, ont suffi pour digérer complètement le plasmide pBR322. Ainsi, afin d'assurer la digestion optimale du plasmide pBR322, la DNase I a été incubée pendant 60 minutes avec le plasmide, et l'enzyme a été inactivée à 85°C pendant 5 minutes.

3.2.2. Effets des variations de température sur l'incorporation du plasmide pBR322 dans les liposomes cationiques

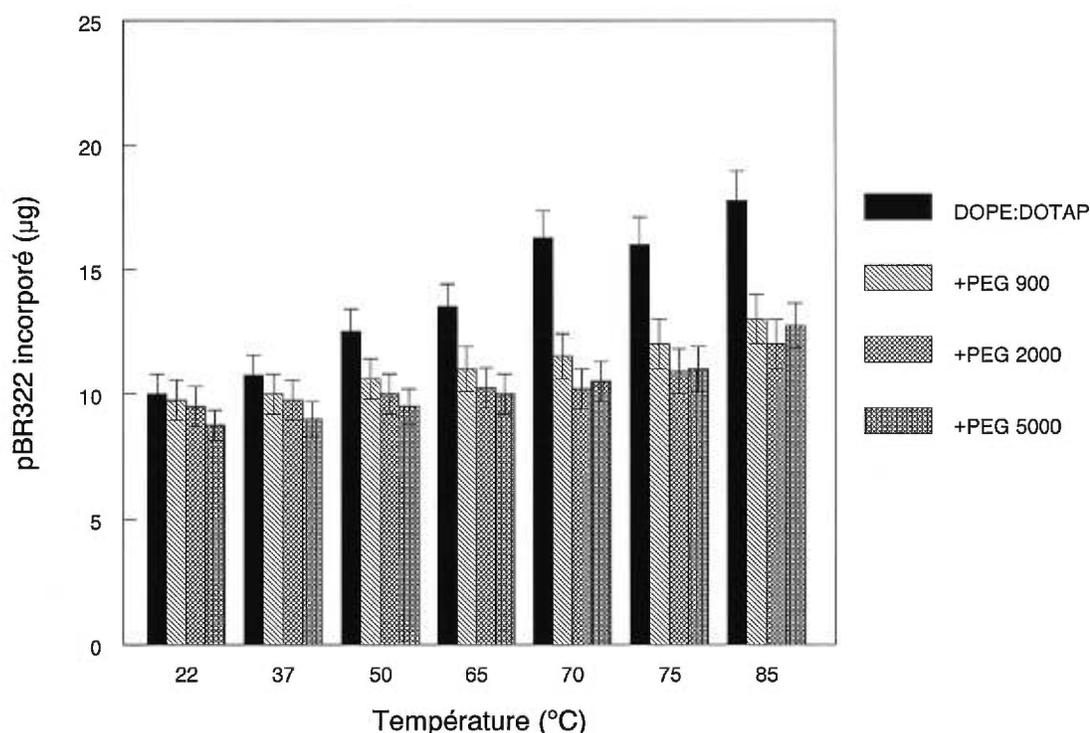


Figure 10: Effet de l'élévation de la température de chauffage sur l'incorporation du plasmide pBR322 dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non. Le plasmide pBR322 (25 µg/ml) a été chauffé en présence des liposomes cationiques DOPE:DOTAP (250 µg/ml), auxquels ont été incorporés initialement 10 mol% de CHOL-PEG₉₀₀, 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀ ou 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀. L'ADN non-incorporé a été digéré avec la DNase I (80 unités) à 37°C pendant 60 minutes, et l'enzyme a été inactivée après chauffage à 85°C pendant 5 minutes. Le SDS (10 mM) a été incubé à 23°C, pendant 30 minutes afin de dissoudre les bicouches phospholipidiques des liposomes. La quantité de plasmide pBR322 incorporée dans ces liposomes a été déterminée par analyse spectrofluorimétrique avec le BrEt. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

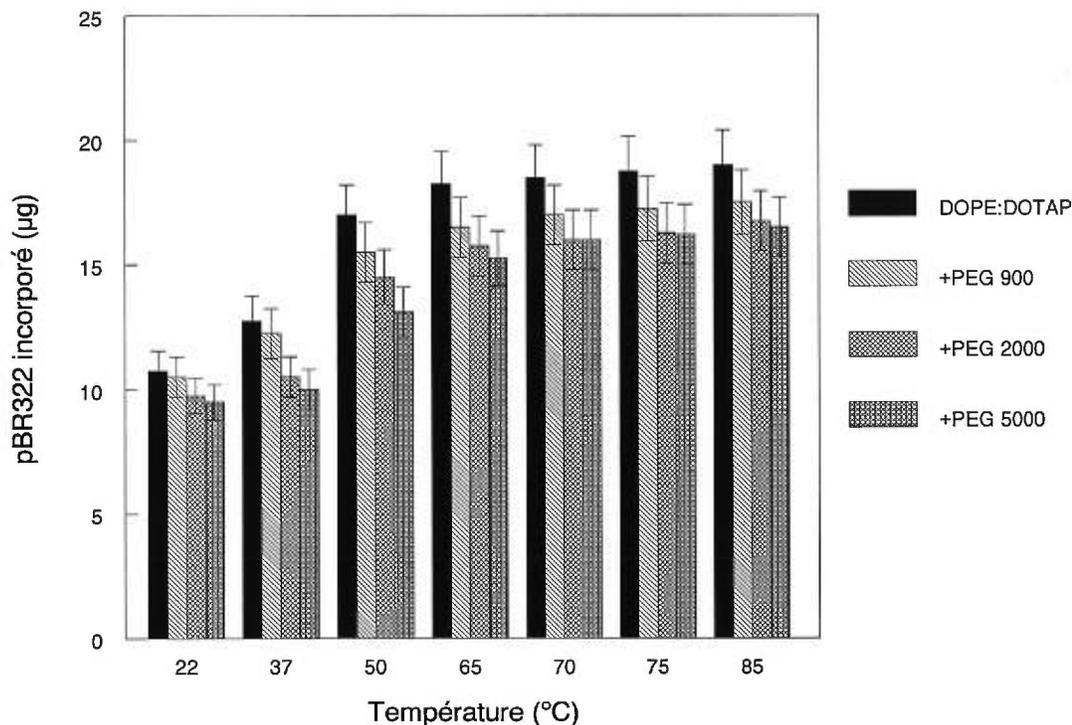


Figure 11: Influence de l'élévation de la température de chauffage sur l'incorporation du plasmide pBR322 linéarisé dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non. Vingt cinq µg de plasmide pBR322 linéarisé ont été chauffés en présence des liposomes cationiques DOPE:DOTAP (250 µg/ml), auxquels ont été incorporés initialement 10 mol% de CHOL-PEG₉₀₀, 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀ ou 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

Les figures 10 et 11 illustrent que le chauffage du plasmide pBR322 circulaire ou linéaire avec les liposomes DOPE:DOTAP (en présence ou en absence de CHOL-PEG₉₀₀ ou de dérivés de DSPE-PEG) à des rapports de masse ADN-liposomes cationiques de 1:10, contribue à une augmentation considérable de la quantité de plasmide pBR322 incorporée dans les liposomes cationiques et ce, à mesure qu'on élève la température de chauffage des complexes pBR322-DOPE:DOTAP. Environ 12.5 µg de plasmide pBR322 linéarisé sont incorporés dans les liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ après leur chauffage à 50°C, et environ 11 µg de plasmide linéarisé sont incorporés après le chauffage à 37°C. De plus, une température minimale de 75°C est requise pour obtenir une incorporation de 12.5 µg/ml du plasmide pBR322 sous sa forme circulaire. Notons que l'incubation des liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non avec le SDS, se traduit par une diminution significative des mesures de diamètre

et de potentiel ζ de ces liposomes et le SDS n'interfère pas avec la liaison ADN-BrEt (résultats non présentés).

3.2.3. Courbe de croissance des bactéries *E. coli*

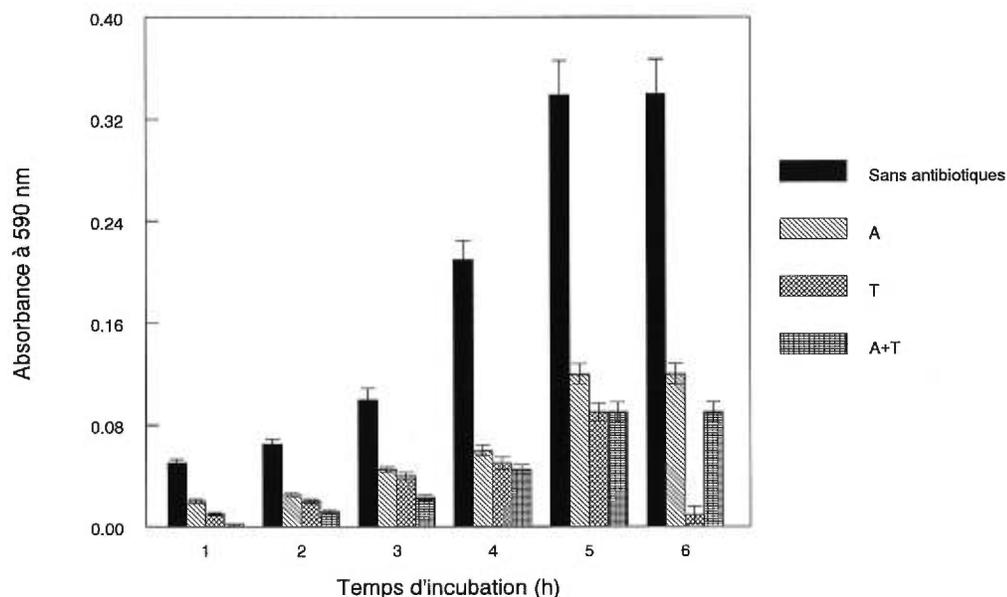


Figure 12: Courbe de croissance des bactéries *E. coli* et résistance aux antibiotiques Ampicilline (A) et Tétracycline (T). Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

La figure 12 illustre que cinq heures d'incubation à 37°C des bactéries *E. coli* dans le milieu LB, ont suffi pour assurer une croissance exponentielle des bactéries *E. coli* (apparition d'un plateau). L'ajout de l'ampicilline ou de la tétracycline empêche la croissance d'environ 70 % de bactéries *E. coli*; cette diminution est d'autant plus accentuée lorsque les bactéries sont exposées simultanément aux deux antibiotiques ampicilline et tétracycline. En effet, environ 90% des bactéries *E. coli* s'avèrent non-résistantes aux antibiotiques.

3.2.3.1. Stabilité des liposomes cationiques dans le milieu de croissance des bactéries *E. coli*

Tableau 3. Effet du milieu de culture LB des bactéries *E. coli* sur les propriétés physico-chimiques des liposomes cationiques DOPE:DOTAP.

Formulation liposomique ($\mu\text{mol/ml}$ de lipides)	Diamètre (nm)	Potentiel ζ (mV)
DOPE:DOTAP*	153.8 ± 12.6	$+33.2 \pm 2.2$
DOPE:DOTAP:DSPE-PEG ₅₀₀₀	171.0 ± 15.1	-1.7 ± 1.2
DOPE:DOTAP + LB	1343.5 ± 69.2	-2.2 ± 1.1
DOPE:DOTAP:DSPE-PEG ₅₀₀₀ +LB	920.3 ± 18.1	-18.1 ± 1.3

*Les liposomes cationiques DOPE:DOTAP (auxquels ont été incorporés initialement 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀) ont été incubés à 37°C dans 1 ml de milieu de culture LB des bactéries *E. coli*, par rapport aux témoins incubés dans le TPS. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

Le tableau 3 illustre que les liposomes DOPE:DOTAP, incubés à 37°C pendant 60 minutes dans 1 ml de milieu LB, se sont fortement agrégés (augmentation du diamètre par un facteur de 9). L'incubation des liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ dans le milieu de croissance LB des bactéries s'est traduite par une augmentation d'un facteur d'environ 5 de leur diamètre (agrégation). Une diminution d'un facteur d'environ 15 du potentiel ζ des liposomes DOPE:DOTAP et d'environ 9 pour les liposomes "pegylés", a été obtenue après l'incubation de ces liposomes dans le milieu LB. Les liposomes cationiques DOPE:DOTAP et DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ sont fortement déstabilisés par les composantes du milieu LB, comme les tryptones (peptones produites par la digestion protéolytique de la trypsine), les protéines de l'extrait de levure pouvant former des ponts reliant les liposomes entre-eux, résultant en la formation de gros agrégats. Ainsi, après le choc de chaleur, l'incubation des liposomes cationiques a été effectuée dans 1 ml de 10 mM de tampon phosphate de sodium contenant 0.85% de solution saline de NaCl à pH 7.4, afin de préserver le plus possible l'intégrité structurale des liposomes cationiques DOPE:DOTAP.

3.2.3.2. Interactions entre les liposomes cationiques et les bactéries *E. coli*

Avant d'introduire les complexes pBR322-liposomes cationiques DOPE:DOTAP dans le milieu de culture LB des bactéries *E. coli*, l'effet des liposomes cationiques sur la croissance des bactéries *E. coli* a été vérifié.

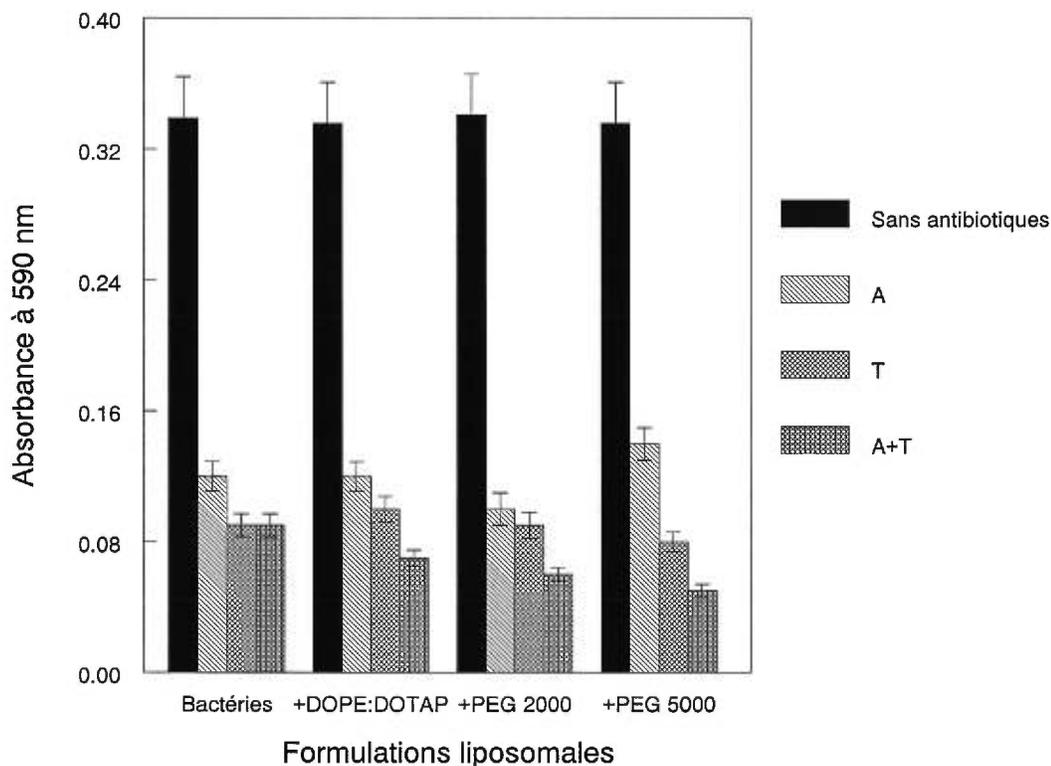


Figure 13: Effet des liposomes cationiques DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, sur la croissance des bactéries *E. coli*. Dix $\mu\text{mol/ml}$ de liposomes cationiques DOPE:DOTAP, auxquels ont été incorporés initialement 10 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀, ont été déposés pendant 10 minutes sur glace (0°C) avec 100 μl de bactéries *E. coli* (6×10^6), et ont subi un choc de chaleur à 42°C pendant 2 minutes. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

La figure 13 illustre que la présence de 10 $\mu\text{mol/ml}$ des liposomes DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, incubés pendant 5 heures avec 100 μl de bactéries *E. coli*, avec ou sans antibiotiques, n’affecte pas significativement la croissance des bactéries, comparée à celle obtenue en l’absence de ces liposomes.

3.2.3.3. Linéarisation, purification et intégrité du plasmide pBR322

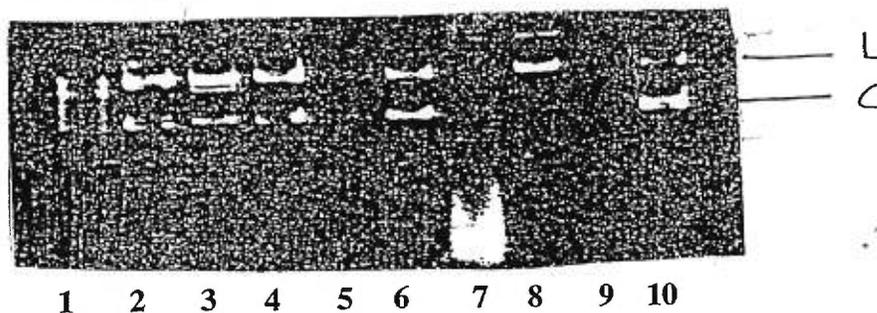


Figure 14: Électrophorèse sur gel d'agarose du plasmide pBR322 (25 µg/ml), circulaire (C) ou linéarisé (L), incorporé par chauffage à 85°C, dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP (250 µg/ml), présentant ou non initialement 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀.

- Ligne 1= DOPE:DOTAP + plasmide pBR322 à 22°C, +DNase I.
- Ligne 2= DOPE:DOTAP + plasmide pBR322 à 22°C.
- Ligne 3= DOPE:DOTAP + plasmide pBR322 chauffé à 85°C, +DNase I.
- Ligne 4= DOPE:DOTAP + plasmide pBR322 chauffé à 85°C.
- Ligne 5= plasmide pBR322 chauffé à 85°C,+ DNase I.
- Ligne 6= plasmide pBR322 chauffé à 85°C.
- Ligne 7= DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ + plasmide pBR322 à 22°C+ DNase I.
- Ligne 8= DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ + plasmide pBR322 à 22°C
- Ligne 9= plasmide pBR322 à 22°C+ DNase I.
- Ligne 10= plasmide pBR322 à 22°C.

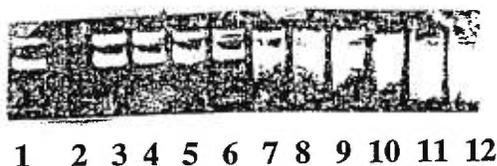


Figure 15: Électrophorèse sur gel d'agarose du plasmide pBR322, incorporé par chauffage à 70°C ou à 85°C, dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP, présentant ou non initialement 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀.

- Ligne 1= le plasmide pBR322 chauffé à 85°C.
- Ligne 2= le plasmide pBR322 chauffé à 85°C,+ DNase I.
- Ligne 3= DOPE:DOTAP + plasmide pBR322 chauffé à 85°C.
- Ligne 4= DOPE:DOTAP + plasmide pBR322 chauffé à 85°C, +DNase I.
- Ligne 5= DOPE:DOTAP + plasmide pBR322 chauffé à 70°C.
- Ligne 6= DOPE:DOTAP + plasmide pBR322 chauffé à 70°C, +DNase I.
- Ligne 7= DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ + plasmide pBR322 chauffé à 85°C.
- Ligne 8= DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ + plasmide pBR322 chauffé à 85°C+ DNase I.
- Ligne 9= DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ + plasmide pBR322 chauffé à 70°C.
- Ligne 10= DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ + plasmide pBR322 chauffé à 70°C+ DNase I.
- Ligne 11= DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ + plasmide pBR322 à 22°C.
- Ligne 12= DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ + plasmide pBR322 à 22°C+ DNase I.

La figure 14 illustre qu'en se basant sur l'intensité des bandes sur le gel d'agarose, le chauffage à 85°C n'affecte pas l'intégrité du plasmide libre pBR322 sous sa forme circulaire ou linéaire, en l'absence de DNase I (lignes 2 et 4). Vingt-cinq µg de plasmide pBR322 sous sa forme circulaire ou linéaire, chauffés à 85°C ou maintenus à 23°C, sont complètement digérés par 80 unités de DNase I, après 60 minutes d'incubation à 37°C (lignes 1 et 3). En se basant sur l'intensité des bandes et l'apparition de traînées, le plasmide pBR322 circulaire ou linéaire, associé aux liposomes DOPE:DOTAP par chauffage à 85°C, a davantage été protégé de sa dégradation par la DNase I, comparé au plasmide libre maintenu à 23°C ou chauffé à 85°C (lignes 1-10). Le plasmide pBR322 sous sa forme circulaire ou linéaire, préalablement incubé à 23°C avec les liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ et extrait de ces liposomes, a moins bien résisté à la digestion par la DNase I (apparition d'une traînée, ligne 7), comparé au plasmide pBR322, introduit dans les liposomes DOPE:DOTAP.

La figure 15 démontre qu'en se basant sur l'intensité des bandes et l'apparition de traînées, le plasmide pBR322 libre exposé à la DNase I est complètement digéré par l'enzyme (ligne 2), tandis que l'ADN associé aux liposomes cationiques DOPE:DOTAP par chauffage à 70°C et 85°C, est beaucoup moins vulnérable à la dégradation par la DNase I, que l'ADN libre (lignes 2-6). Les liposomes cationiques DOPE:DOTAP auxquels on a greffé initialement 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀ et associés par chauffage à 70°C et 85°C au plasmide pBR322, protège moins bien le plasmide pBR322 de sa digestion par la DNase I (apparition de traînées), comparés aux liposomes DOPE:DOTAP sans PEG (lignes 7-10). Il apparaît également que l'intensité des bandes sur le gel d'agarose est plus importante pour le plasmide incorporé par chauffage à 85°C dans les liposomes DOPE:DOTAP "pegylés" ou non, comparée à l'intensité des bandes obtenues lorsque le plasmide pBR322 a été incorporé par chauffage à 60°C dans ces liposomes ou incorporé à 23°C (lignes 3-12). Le chauffage des complexes pBR322-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ à 60°C et à 85°C améliore considérablement l'incorporation du plasmide pBR322 dans les liposomes DOPE:DOTAP "pegylés" ou non et protège davantage le plasmide pBR322 de sa digestion par la DNase I.

3.2.4. Insertion du plasmide pBR322 ou des complexes pBR322-liposomes cationiques dans les bactéries *E. coli*

Tableau 4: Effet du plasmide pBR322 de forme circulaire ou linéarisée sur la croissance des bactéries *E. coli* et résistance à l'ampicilline et à la tétracycline.

	Absorbance à 590 nm	
	plasmide circulaire	plasmide linéaire
Sans antibiotiques	0.314 ± 0.03	0.344 ± 0.02
A	0.12 ± 0.001	0.12 ± 0.006
T	0.12 ± 0.012	0.12 ± 0.006
A + T	0.09 ± 0.008	0.09 ± 0.007
plasmide	0.31 ± 0.02	0.345 ± 0.02
plasmide + A	0.247 ± 0.02	0.254 ± 0.015
plasmide + T	0.2 ± 0.015	0.21 ± 0.008
plasmide + A + T	0.21 ± 0.014	0.186 ± 0.006

Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

Le tableau 4 démontre que l'introduction de 25 µg/ml de plasmide pBR322 dans les bactéries *E. coli*, ne provoque pas de changement significatif dans la croissance des bactéries *E. coli*, en l'absence d'antibiotiques. Cependant, lorsque les bactéries ont reçu le plasmide pBR322 et sont exposées aux antibiotiques de l'ampicilline ou de la tétracycline, la croissance des bactéries *E. coli* est significativement améliorée, puisqu' environ 50% plus de bactéries sont devenues résistantes aux antibiotiques, comparées à celles qui n'ont pas reçu le plasmide pBR322. Il convient de mentionner que le plasmide pBR322 possède deux régions codantes, une réservée à l'expression d'une résistance à l'ampicilline (un antibiotique qui inhibe la formation des peptidoglycanes) et une autre, réservée à l'expression d'une résistance à la tétracycline (un antibiotique qui inhibe la synthèse des protéines).

Ainsi, le plasmide pBR322 est actif au sein des bactéries *E. coli* puisqu'il a conféré l'expression d'une résistance aux bactéries à l'ampicilline et à la tétracycline.

Le plasmide pBR322 linéarisé n'a pas conféré aux bactéries l'expression de la résistance à la tétracycline. En effet, lors de la procédure de linéarisation du plasmide pBR322, le

gène codant pour l'expression d'une résistance à la tétracycline a été clivé (voir tableau 4). Le plasmide pBR322 linéarisé est demeuré actif au sein des bactéries *E. coli*, car il a conféré aux bactéries l'expression d'une résistance à l'ampicilline.

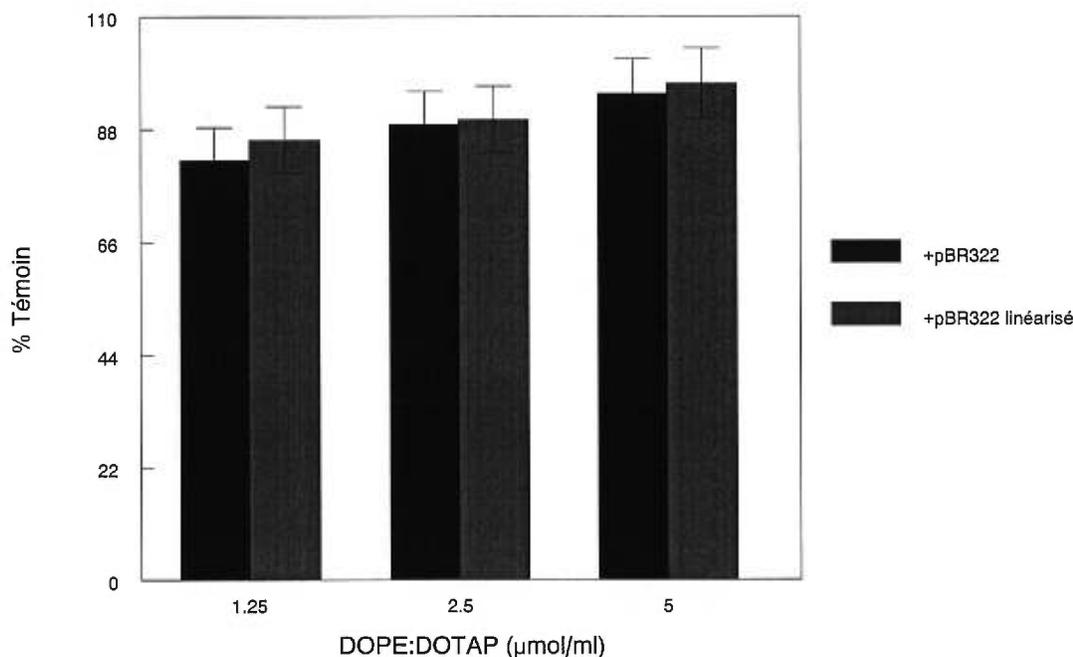


Figure 16: Effet du chauffage à 85°C des complexes pBR322-DOPE:DOTAP sur la résistance des bactéries *E. coli* à l'ampicilline. Le Témoin représente la croissance normale des bactéries *E. coli* sans ampicilline fixée à 100%. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

La figure 16 illustre que le plasmide pBR322 (25 µg/ml), incorporé par chauffage à 85°C dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP, confère aux bactéries *E. coli* une résistance à l'ampicilline 87% fois celle obtenue avec le Témoin. Le Témoin représente la croissance normale des bactéries *E. coli* sans ampicilline, fixée à 100%. L'incorporation du plasmide pBR322 dans les liposomes DOPE:DOTAP, assure une résistance accrue aux bactéries *E. coli* à l'ampicilline, comparée à celle obtenue avec le plasmide précipité au CaCl₂ (tableau 4). La concentration minimale de 1.25 µmol/ml de liposomes DOPE:DOTAP a été choisie, car c'est à cette concentration que la résistance des bactéries *E. coli* aux antibiotiques a commencé à diminuer. C'est également à cette concentration, qu'il y a le moins de toxicité des liposomes cationiques (environ 5% pour DOPE:DOTAP et 7% pour sa forme "pegylée" DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀).

3.2.4.1. Effet du chauffage sur l'expression du pBR322 libre ou liposomal au sein des bactéries *E. coli*

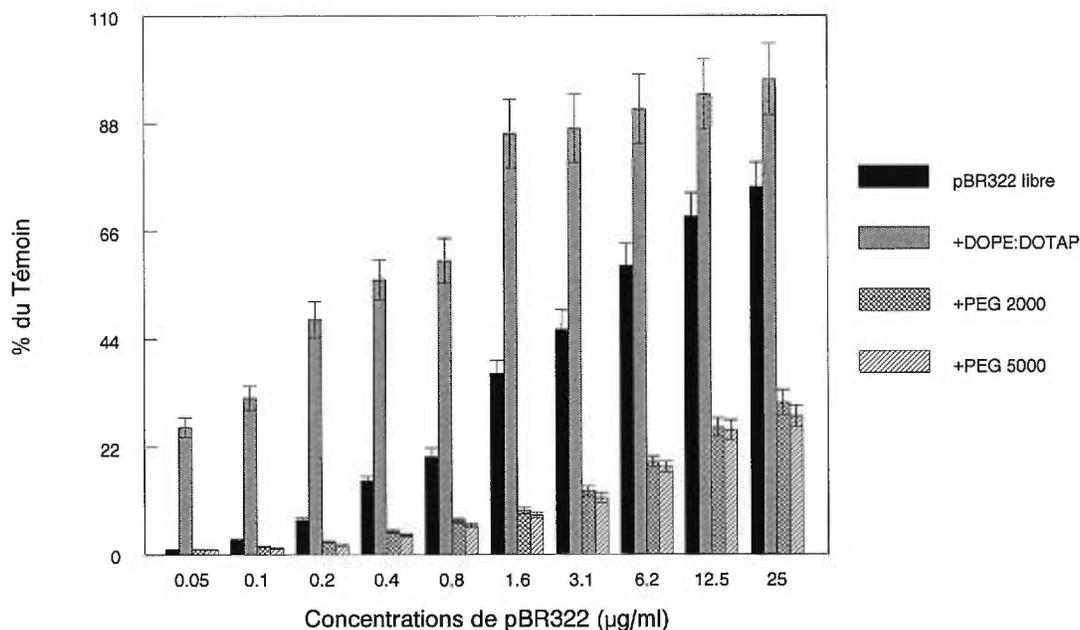


Figure 17: Effet du chauffage à 85°C du plasmide pBR322 ou des complexes pBR322-DOPE:DOTAP “pegylés” ou non sur la résistance des bactéries *E. coli* à l'ampicilline. Le plasmide pBR322 a été incorporé par chauffage à 85°C pendant 30 minutes dans les liposomes DOPE:DOTAP (1.25 µmol/ml) auxquels ont été incorporés 10 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀. La quantité d'ADN non-incorporée a été éliminée par centrifugation à 13,000g, pendant 30 minutes à 23°C. Le Témoin représente la croissance normale des bactéries *E. coli* sans ampicilline, fixée à 100%. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

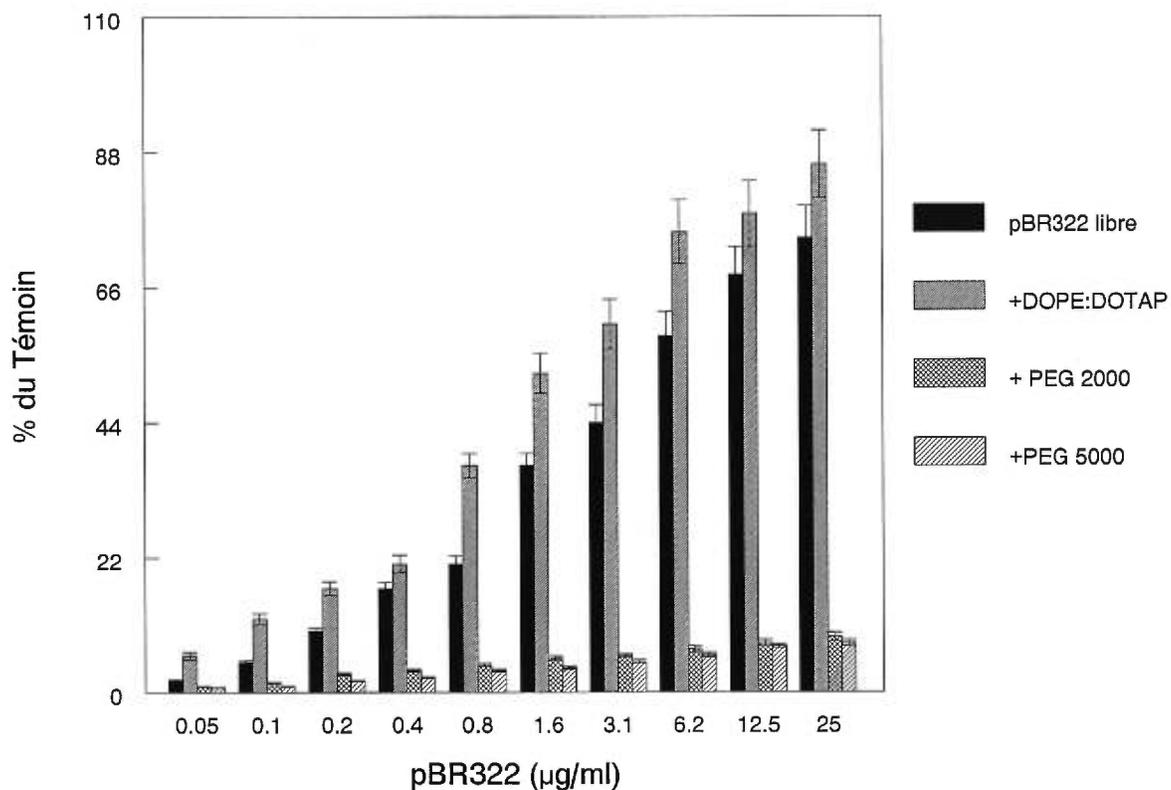


Figure 18: Effet du plasmide pBR322, des complexes pBR322-DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, formés à 23°C, sur la résistance des bactéries *E. coli* à l'ampicilline. Le plasmide pBR322 a été incorporé à 23°C pendant 30 minutes, dans 1.25 µmol/ml de liposomes DOPE:DOTAP auxquels ont été incorporés 10 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

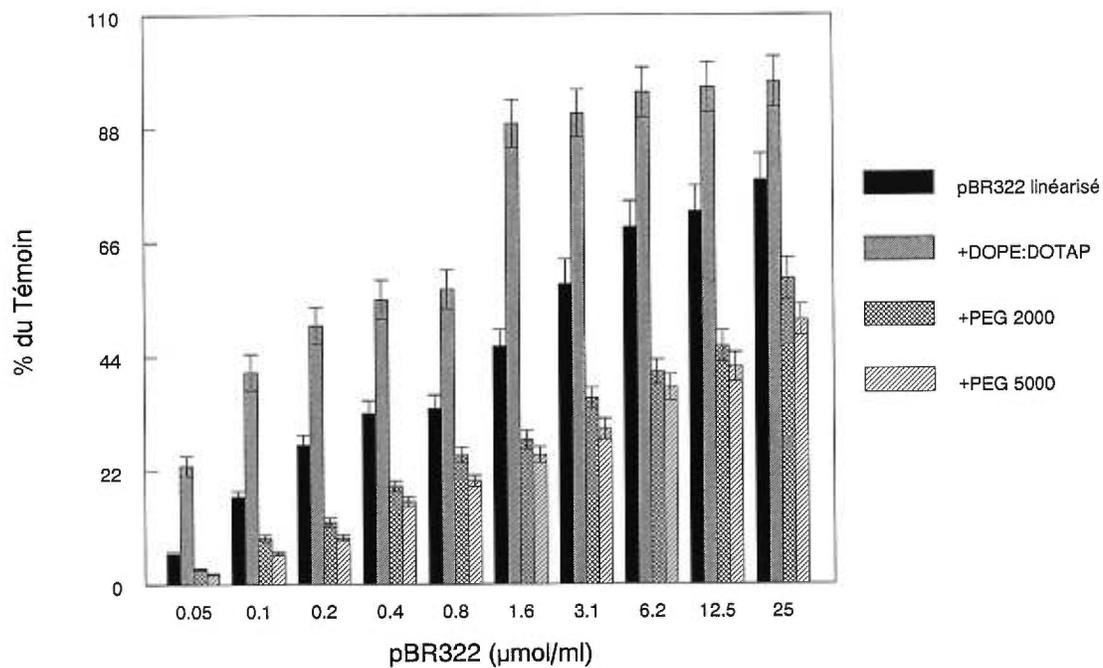


Figure 19: Effet du chauffage à 85°C du plasmide pBR322 linéarisé ou des complexes pBR322 linéarisé-DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, sur la résistance des bactéries *E. coli* à l’ampicilline. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

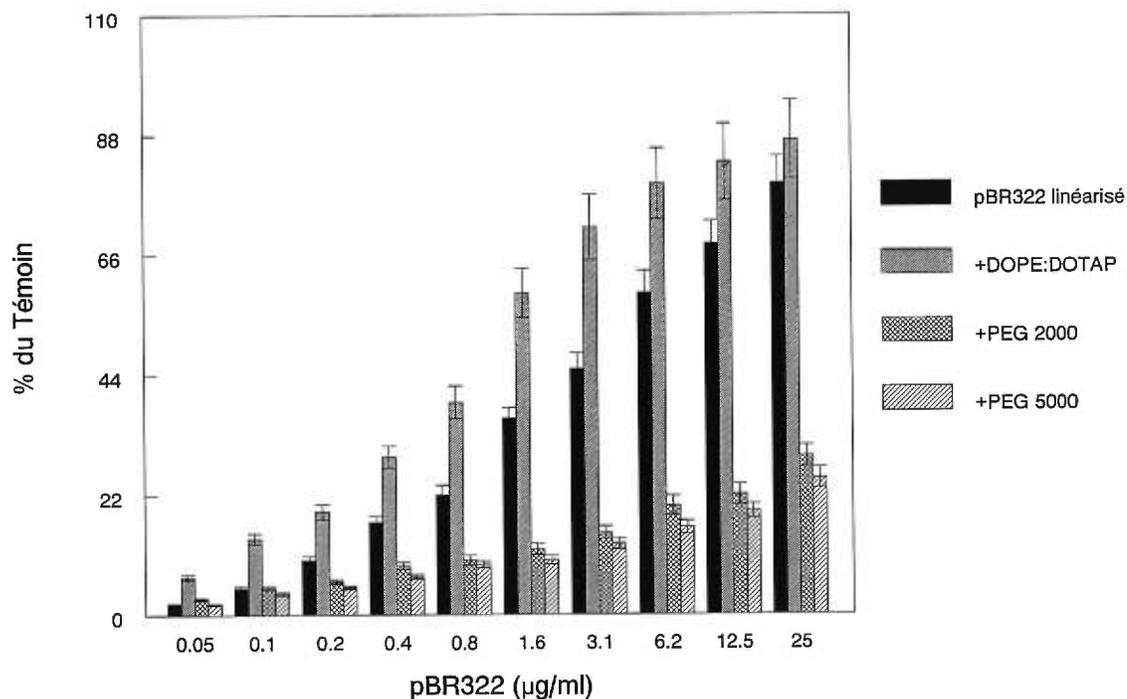


Figure 20: Effet du plasmide pBR322 linéarisé ou des complexes pBR322-DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, formés à 23°C, sur la résistance des bactéries *E. coli* à l'ampicilline. Le plasmide pBR322 linéarisé a été incorporé à 23°C pendant 30 minutes, dans 1.25 µmol/ml de liposomes DOPE:DOTAP avec ou sans 10 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou 10 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

Les figures 17-20 illustrent que le chauffage à 85°C du plasmide pBR322 de forme circulaire ou linéaire, précipité au CaCl₂ sur les bactéries *E. coli*, confère des niveaux de résistance aux bactéries *E. coli* à l'ampicilline, similaires à ceux obtenus avec le plasmide maintenu à 23°C. Le plasmide pBR322 linéarisé assure une meilleure croissance aux bactéries en présence de l'ampicilline, comparée à sa forme circulaire. Une concentration minimale de plasmide circulaire ou linéaire précipité au CaCl₂ chauffée à 85°C, comprise entre environ 3.1 µg/ml et 6.3 µg/ml, permet d'assurer une résistance des bactéries exposées à l'ampicilline, correspondant à environ 50% de celle obtenue avec le Témoin. Cependant, il suffit qu'une concentration initiale de plasmide pBR322, comprise entre environ 0.2 µg/ml et 0.4 µg/ml, soit incorporée dans 1.25 µmol/ml de liposomes DOPE:DOTAP et introduite au sein des bactéries *E. coli*, pour avoir une croissance des bactéries exposées à l'ampicilline correspondant à environ 50%

du Témoin. De plus, les formulations de plasmide pBR322-DOPE:DOTAP ont donné des niveaux de résistance aux bactéries *E. coli* à l'ampicilline, comparables à ceux obtenus avec les formulations de pBR322 linéarisé-DOPE:DOTAP.

3.2.5. Transfection du plasmide pSV- β -Gal dans les cellules Cos-7 (influence des conditions expérimentales)

3.2.5.1. Précipitation au phosphate de calcium

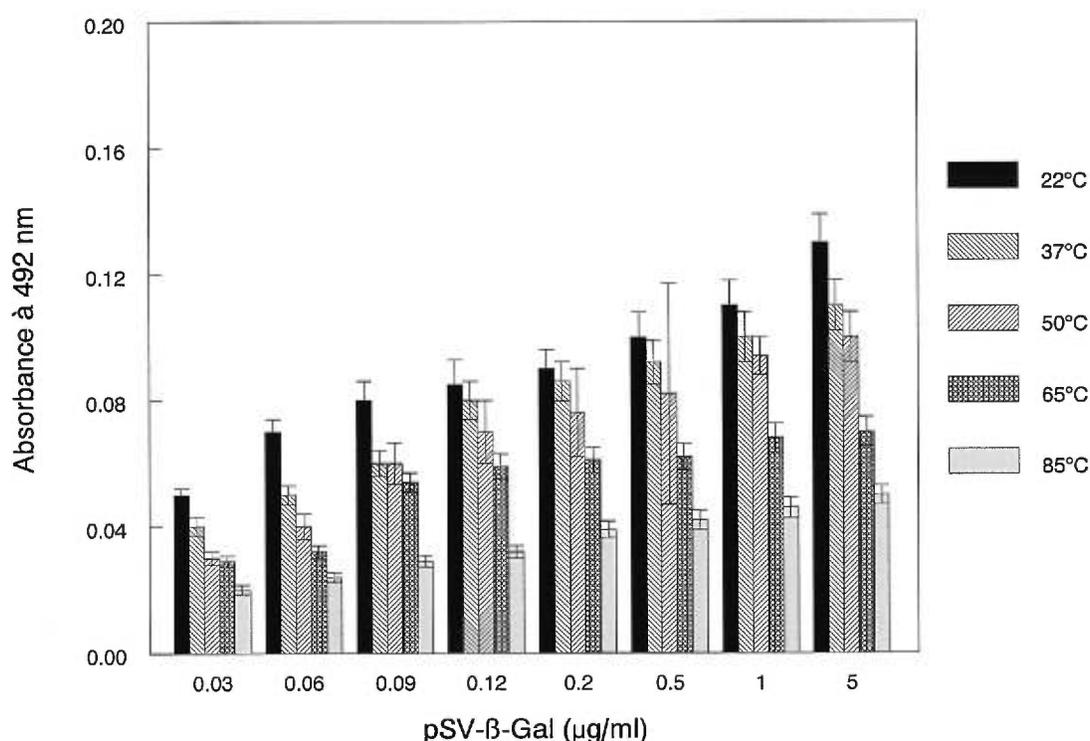


Figure 21: Effet du chauffage sur l'expression du plasmide pSV- β -Gal précipité au phosphate de calcium (CaPO_4) et introduit dans les cellules de mammifère Cos-7. Le plasmide pSV- β -Gal précipité au CaPO_4 chauffé à 37°C, 50°C, 65°C et 85°C pendant 30 minutes a été pré-incubé à 37°C dans une atmosphère contenant 5-10% de CO_2 pendant 4 heures avec les cellules adhérentes Cos-7, à 40-50% de confluence. Après l'incubation, le milieu cellulaire a été remplacé par du DMEM-FCS frais et les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pour une période totale de 48 heures. L'activité de la β -Galactosidase a été déterminée par analyse spectrophotométrique. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

La figure 21 illustre que le chauffage à 37°C, 50°C, 65°C et à 85°C du plasmide pSV- β -Gal précipité au CaPO_4 diminue l'activité de la β -Galactosidase. Cette diminution d'activité enzymatique est d'autant plus accentuée à 65°C et à 85°C. Le plasmide pSV- β -Gal subit probablement une dénaturation à une température située aux environs de 85°C.

La dislocation des brins complémentaires du plasmide pSV- β -Gal expliquerait sans doute la baisse plus prononcée de l'activité la β -Galactosidase, particulièrement à 65°C et à 85°C. L'incorporation par chauffage du plasmide pSV- β -Gal dans les liposomes DOPE:DOTAP améliore significativement l'activité de la β -Galactosidase au sein des cellules Cos-7, correspondant à environ 80% de celle obtenue avec le plasmide précipité au CaPO₄. Ces résultats suggèrent que l'incorporation du plasmide pSV- β -Gal dans les liposomes protège davantage le plasmide des effets du chauffage.

3.2.5.2. Influence de l'insertion du DSPE-PEG₅₀₀₀ à la surface des liposomes DOPE:DOTAP sur les propriétés des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP

Tableau 5. Effet de l'insertion du DSPE-PEG₂₀₀₀ à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP sur l'incorporation du plasmide pSV- β -Gal dans ces liposomes.

Formulations liposomiques (μ g de lipides)	Quantités d'ADN incorporées (μ g)
pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP	4.6
pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG ₂₀₀₀ incorporé*	1.4
pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG ₂₀₀₀ inséré**	4.4

*Dix μ g de plasmide pSV- β -Gal ont été incubés à 37°C pendant 30 minutes avec 50 μ g de liposomes DOPE:DOTAP auxquels ont été incorporés 10 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀. **Dix mol%, 25 mol % ou 50 mol % de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de DSPE-PEG₅₀₀₀ ont été insérés dans les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP déjà formés et incubés à 23°C pendant 60 minutes. Le DSPE-PEG₂₀₀₀ a été préparé en dissolvant des concentrations variables de PEG dans du TPS. Le DSPE-PEG₂₀₀₀ a été dosé avec le réactif de Bradford à 595 nm. La quantité d'ADN incorporée dans ces liposomes a été déterminée par analyse spectrofluorimétrique avec le BrEt. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

Tableau 6. Effet de l'insertion du DSPE-PEG₂₀₀₀ à la surface des complexes pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP sur leur diamètre et potentiel ζ.

Formulations liposomiques (µg de lipides)	Diamètres (nm)	Potentiels ζ (mV)
DOPE:DOTAP	169.1 ± 15.1	+34.6 ± 1.6
DOPE:DOTAP:DSPE-PEG ₂₀₀₀ incorporé	174.9 ± 17.2	-2.8 ± 0.2
pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP	175.1 ± 19.4	+34.0 ± 1.2
pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG ₂₀₀₀ inséré	181.2 ± 20.2	-2.9 ± 0.7

Les changements de diamètre et de potentiel ζ des liposomes ont été déterminés respectivement par spectroscopie de corrélation de photons dans un Coulter 4N et par dispersion électrophorétique de Doppler dans un Coulter DELSA 440SX. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

Le tableau 5 révèle que l'insertion du DSPE-PEG₂₀₀₀ après la formation des complexes pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP améliore d'un facteur d'environ 3 l'incorporation du plasmide pSV-β-Gal dans les liposomes DOPE:DOTAP, comparée à celle obtenue avec les liposomes DOPE:DOTAP auxquels a été incorporé le DSPE-PEG₂₀₀₀. De plus, l'insertion du DSPE-PEG₂₀₀₀ après la formation des complexes pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP a donné lieu à une incorporation similaire à celle obtenue avec les liposomes DOPE:DOTAP sans DSPE-PEG₂₀₀₀.

Le tableau 6 indique que la présence d'une couche hydrophile de DSPE-PEG₂₀₀₀ masque la charge de surface des liposomes DOPE:DOTAP sans pour autant augmenter significativement leur diamètre. L'insertion du DSPE-PEG₂₀₀₀ après la formation des complexes pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP, n'affecte pas les mesures de diamètre et de potentiel ζ des liposomes, comparée à celles obtenues lors de l'incorporation du DSPE-PEG₂₀₀₀ au moment même de la préparation des liposomes DOPE:DOTAP.

3.2.5.3. Transfections

Afin d'optimiser l'efficacité de transfection du plasmide pSV- β -Gal dans les cellules Cos-7, l'influence du temps de pré-incubation du plasmide et celle de la concentration des lipides cationiques sur l'expression de la β -Galactosidase ont été étudiées. Une incubation prolongée de 24 heures des complexes pSV- β -Gal dans les cellules Cos-7 s'est traduite par une diminution d'un facteur de 2 des activités de la β -Galactosidase. Ces résultats suggèrent que la diminution de l'activité de la β -Galactosidase est due à l'augmentation de la toxicité des lipides cationiques au sein des cellules Cos-7.

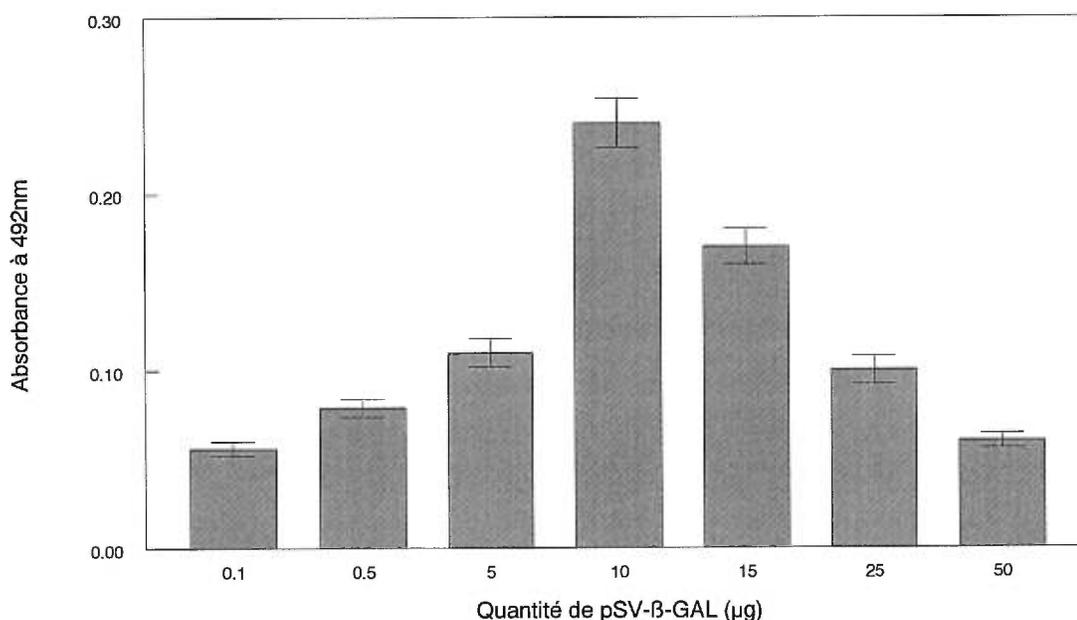


Figure 22: Influence de la concentration de plasmide pSV- β -Gal précipité au CaPO_4 , et pré-incubé pendant 4 heures avec les cellules Cos-7, sur l'expression de la β -Galactosidase. Des concentrations variables de plasmide pSV- β -Gal précipité au CaPO_4 ont été chauffées à 37°C pendant 30 minutes, et pré-incubées pendant 4 heures à 37°C dans les cellules adhérentes Cos-7 à 40-50% de confluence. Le milieu cellulaire a été remplacé par du DMEM-FCS frais et les cellules ont ensuite été incubées pour une période totale de 48 heures. L'activité de la β -Galactosidase a été déterminée par analyse spectrophotométrique. Les valeurs obtenues sont les moyennes de 3 expériences \pm les écarts types.

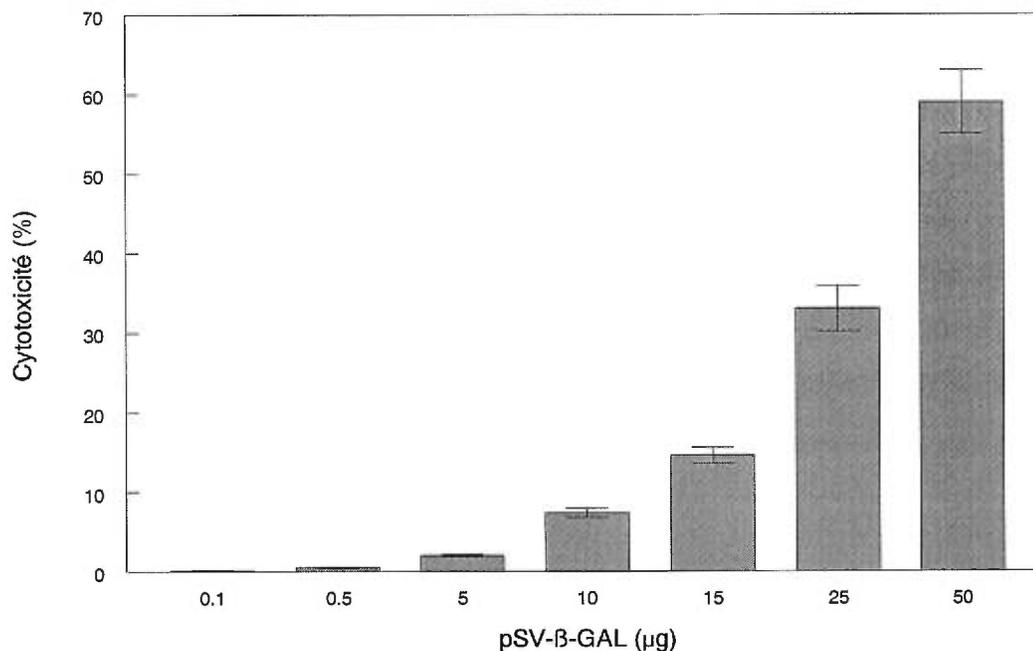


Figure 23: Cytotoxicité du plasmide pSV-β-Gal précipité au CaPO₄, déterminée par le test colorimétrique de libération de la LDH. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

Les figures 22 et 23 montrent que l'augmentation de la quantité de plasmide pSV-β-Gal précipité au CaPO₄ se traduit par une élévation de l'activité de la β-Galactosidase et ce, jusqu'à 10 μg de plasmide pSV-β-Gal. À 10 μg de plasmide pSV-β-Gal, l'activité optimale de la β-Galactosidase est égale à une D.O de 0.24. Entre 10 μg et 50 μg de plasmide pSV-β-Gal, des pourcentages importants de cytotoxicité commencent à apparaître. La réduction de l'activité de la β-Galactosidase est associée à une augmentation de la cytotoxicité.

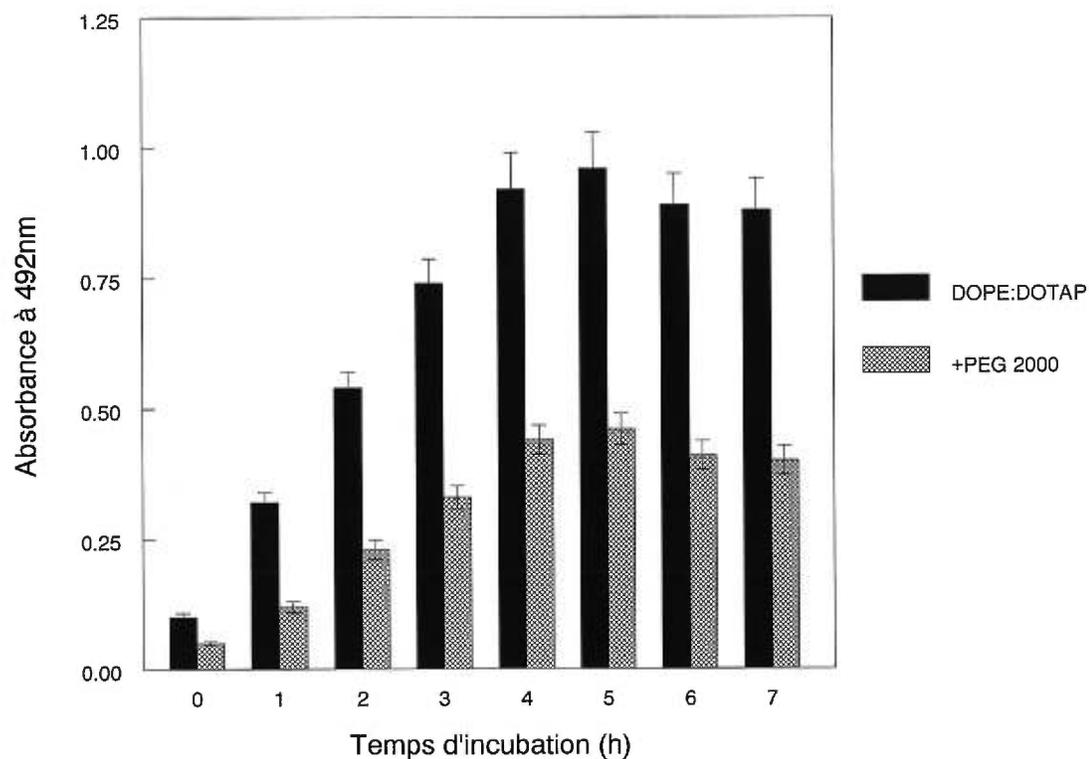


Figure 24: Influence du temps de pré-incubation de 5 µg de plasmide pSV-β-Gal incorporés dans 50 µg de liposomes cationiques DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, sur l’expression de la β-Galactosidase. Les cellules Cos-7 (5.4×10^5 cellules) ont été transfectées par 5 µg de plasmide pSV-β-Gal et 50 µg de liposomes DOPE:DOTAP, auxquels ont été insérés initialement 10 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀. Ces complexes ont été pré-incubés à 37°C dans le DMEM des cellules Cos-7. Le milieu de culture a ensuite été aspiré, remplacé par 200 µl de DMEM-FCS, et les cellules ont été incubées à 37°C, pour une période de 48 heures suivie de la détermination de l’expression de la β-Galactosidase. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

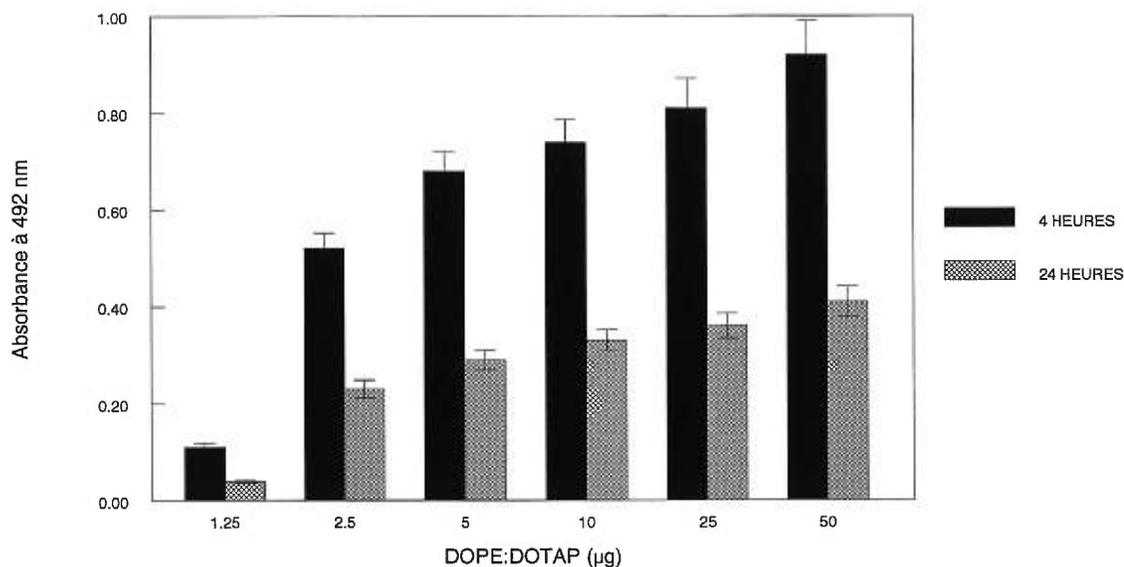


Figure 25: Effet du temps de pré-incubation des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP dans les cellules Cos-7, sur l'expression de la β -Galactosidase. Les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP (rapport de masse 1:5) ont été incubés à 37°C dans 200 μ l de DMEM des cellules Cos-7 à 40-50% de confluence, pendant 4 heures ou 24 heures dans une atmosphère humide contenant 5-10% de CO₂. Le milieu cellulaire a été remplacé par du DMEM-FCS, et les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pour une période additionnelle de 48 heures, suivi de la détermination de l'activité de la β -Galactosidase. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

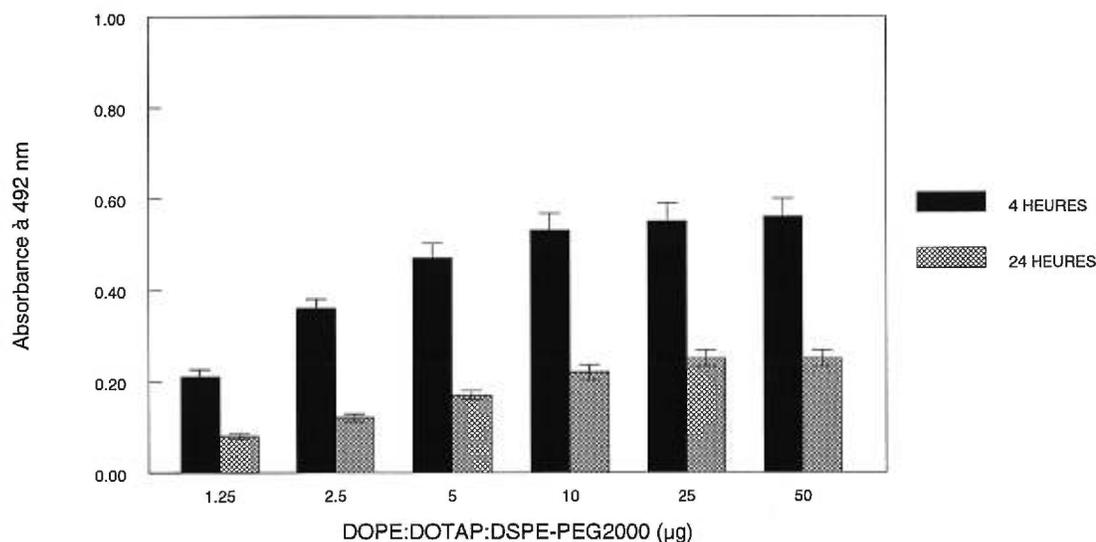


Figure 26: Effet du temps de pré-incubation des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ dans cellules Cos-7, sur l'expression de la β -Galactosidase. Dix mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ ont été incubés avec les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP à 37°C pendant 60 minutes. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

La figure 24 illustre que le temps requis pour la transfection optimale de 5 μg de plasmide pSV- β -Gal, avec 50 μg de liposomes DOPE:DOTAP ou DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀, est entre 4-5 heures de pré-incubation des complexes dans le DMEM avec les cellules Cos-7.

Les figures 25-26 indiquent qu'aux mêmes concentrations de plasmide pSV- β -Gal précipité au CaPO₄ ou complexées aux liposomes DOPE:DOTAP, l'activité de la β -Galactosidase obtenue suite à la lipofection est jusqu'à 9 fois plus élevée que celle obtenue avec le plasmide pSV- β -Gal précipité au CaPO₄. Suite à l'ajout des micelles de DSPE-PEG₂₀₀₀ à la surface des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP, une activité enzymatique égale à une D.O de 0.56 est obtenue, comparée à une activité enzymatique égale à une D.O de 0.92 pour les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP, après 4 heures de pré-incubation dans le DMEM des cellules Cos-7. La pré-incubation des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP ou pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ (micelles) pendant 24 heures dans le DMEM, a généré des activités de β -Galactosidase environ 2 fois plus faibles que celles obtenues après 4 heures de pré-incubation à 37°C dans les cellules Cos-7. La réduction de l'activité de la β -Galactosidase après 24 heures d'incubation des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP "pegylés" ou non, est associée à l'augmentation de la cytotoxicité (figure 27).

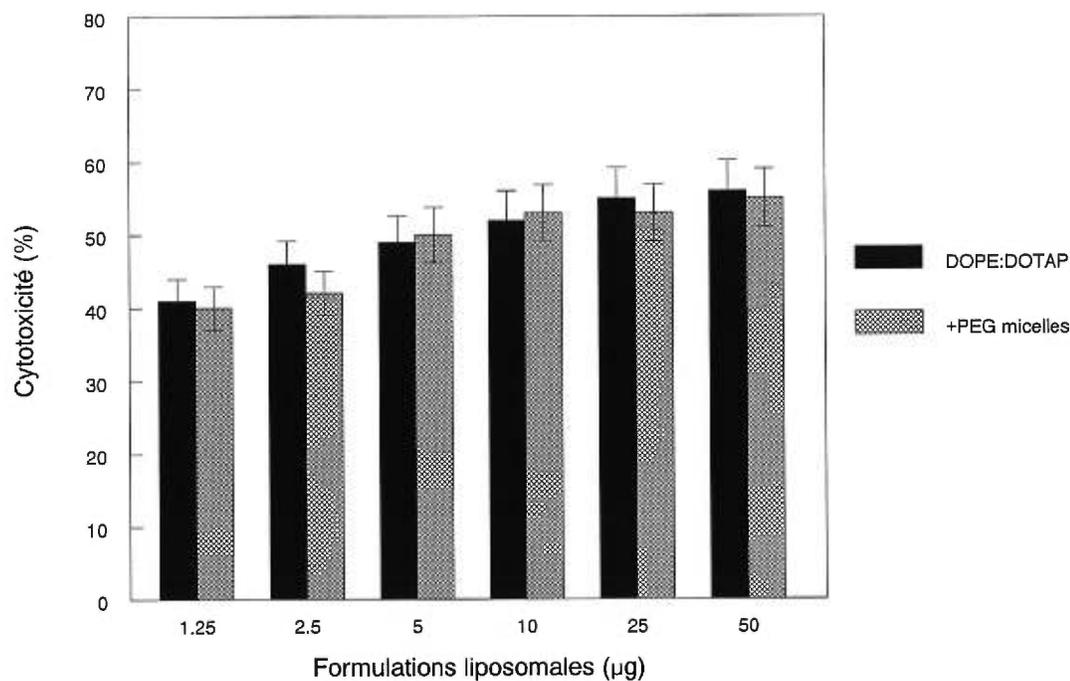


Figure 27: Toxicité des liposomes DOPE:DOTAP, après 24 heures d'incubation des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP "pegylés" ou non, dans le DMEM des cellules Cos-7. La toxicité des liposomes cationiques DOPE:DOTAP (auxquels ont été insérés initialement 10 mol% de micelles de DSPE-PEG₂₀₀₀) a été déterminée par un test colorimétrique basé sur la libération de la LDH, après 48 heures d'incubation des liposomes cationiques dans le DMEM des cellules Cos-7. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts type de trois expériences.

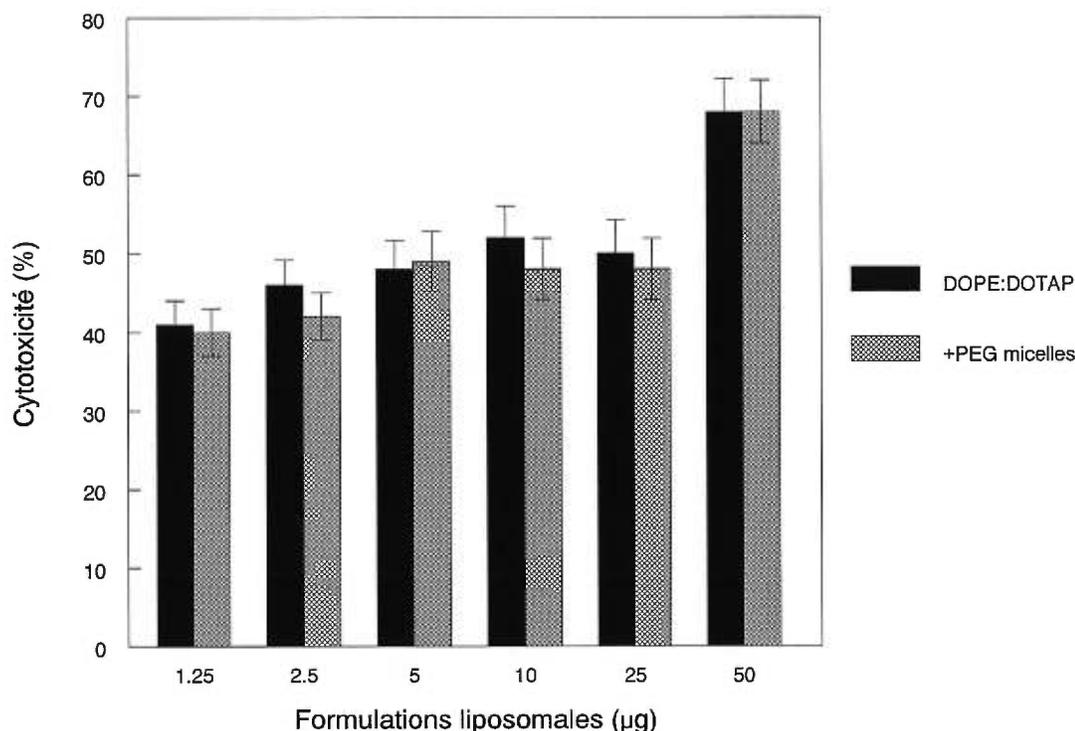


Figure 28: Toxicité des liposomes DOPE:DOTAP, après 24 heures de pré-incubation des complexes pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, dans le DMEM-FCS dans les cellules Cos-7. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

En comparant les figures 27 et 28, l’incubation prolongée de 24 heures des complexes pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP ou pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ dans le DMEM des cellules Cos-7, a donné des pourcentages de toxicité de 56% pour 10 µg de plasmide pSV-β-Gal exposés à 50 µg des liposomes cationiques. Après 24 heures d’incubation de ces complexes, mais cette fois-ci dans le DMEM-FCS, le pourcentage de cytotoxicité a augmenté à environ 70%. La toxicité des liposomes cationiques (probablement associée avec les lipides non-complexés à l’ADN), expliquerait la diminution de moitié de l’activité de la β-Galactosidase après l’exposition prolongée de ces complexes pendant 24 heures dans le DMEM. L’augmentation de la cytotoxicité suite à l’exposition des complexes pendant 24 heures dans le DMEM-FCS, comparée à celle obtenue dans le DMEM, pourrait peut-être s’expliquer par une déstabilisation accrue des liposomes cationiques DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, par les protéines du sérum de veau, présentes dans le DMEM-FCS. De plus, la réduction de l’activité du

plasmide pSV- β -Gal incorporé dans les liposomes DOPE:DOTAP dans les cellules Cos-7 est associée à une augmentation de la toxicité des lipides cationiques.

3.3. Effet de certains constituants biologiques sur la stabilité des liposomes cationiques

Des études supplémentaires ont été réalisées en vue d'éclaircir l'influence de 10% de sérum de veau présent dans le DMEM, sur la stabilité des liposomes cationiques en terme de leur diamètre (agrégation) potentiel ζ et de la rétention liposomale de l'ADN plasmidique.

3.3.1. Sérum de veau

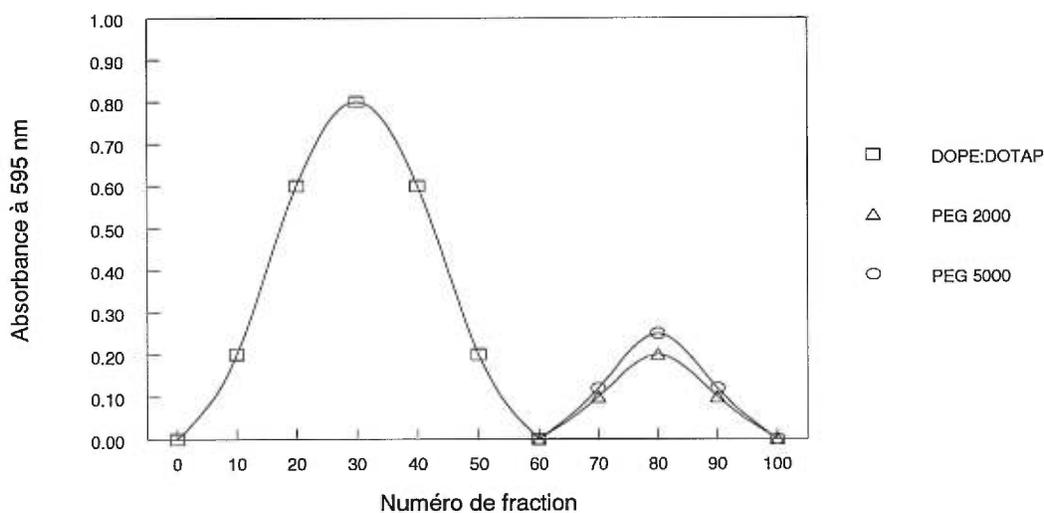


Figure 29: Séparation par chromatographie d'exclusion stérique des liposomes DOPE:DOTAP auxquels ont été incorporés le DSPE-PEG₂₀₀₀ ou le DSPE-PEG₅₀₀₀ de leurs micelles de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de DSPE-PEG₂₅₀₀₀. La séparation des liposomes de leurs micelles de DSPE-PEG a été effectuée par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de Sépharose 2B. La détection des liposomes et de leurs micelles a été effectuée par analyse spectrophotométrique avec le réactif de Bradford et ce, pour chacune des fractions collectées. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

Tableau 7: Influence du sérum de veau sur les propriétés physico-chimiques des liposomes cationiques

	Diamètre (nm)		Potentiel ζ (mV)	
	-sérum	+sérum	-sérum	+sérum
DOPE:DOTAP	304 ± 22	3000 ± 220	+34.5 ± 5	-30.2 ± 4.4
DOPE:DOTAP+ 10 mol%DSPE-PEG ₂₀₀₀	320 ± 20	852 ± 60	-2.2 ± 0.3	-18.9 ± 2.6
DOPE:DOTAP+ 25 mol%DSPE-PEG ₂₀₀₀	332 ± 20	800 ± 52	-1.6 ± 0.2	-9 ± 1
DOPE:DOTAP+ 50 mol%DSPE-PEG ₂₀₀₀	369 ± 22	750 ± 42	-1.1 ± 0.1	-8.2 ± 1.4
DOPE:DOTAP+ 10 mol%DSPE-PEG ₅₀₀₀	321 ± 18	750 ± 50	0.896 ± 0.124	-11.2 ± 1.3
DOPE:DOTAP+ 25 mol%DSPE-PEG ₅₀₀₀	346 ± 20	705 ± 42	0.552 ± 0.08	-8 ± 1
DOPE:DOTAP+ 50 mol%DSPE-PEG ₅₀₀₀	372 ± 22	675 ± 38	0.256 ± 0.04	-5.6 ± 0.7

Séparation par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de Sépharose 2B des liposomes DOPE:DOTAP (auxquels ont été incorporés initialement 10 mol %, 25 mol % ou 50 mol % de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de DSPE-PEG₅₀₀₀) de leurs micelles de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de DSPE-PEG₅₀₀₀. La détection des liposomes et de leurs micelles a été réalisée par analyse spectrophotométrique avec le réactif de Bradford. Les diamètres et potentiels ζ des fractions collectées de liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ (sans micelles) ont été déterminés après l'incubation à 37°C pendant 4 heures de ces liposomes dans le DMEM-FCS. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

Le tableau 7 illustre que les liposomes cationiques DOPE:DOTAP se sont fortement agrégés après 4 heures d'incubation à 37°C dans le DMEM-FCS, comparé à leur incubation dans le DMEM (augmentation d'un facteur d'environ 10 de leur diamètre). L'incubation des liposomes DOPE:DOTAP à 37°C pour une période de 4 heures dans le DMEM-FCS a engendré une diminution significative du potentiel ζ liposomal (+ 34.2 mV à -30.6 mV).

Suite à l'incorporation de 10 mol % de DSPE:PEG₂₀₀₀ à la surface des liposomes DOPE:DOTAP, une augmentation d'un facteur d'environ 3 du diamètre des liposomes DOPE:DOTAP:DSPE:PEG₂₀₀₀ a été obtenue après leur incubation à 37°C pendant 4 heures dans le DMEM-FCS. Le potentiel ζ des liposomes DOPE:DOTAP:DSPE:PEG₂₀₀₀ est passé de -2.6 mV à -18.9 mV. Les diamètres des liposomes DOPE:DOTAP, auxquels ont été incorporés initialement à la surface 25 mol% ou 50 mol % de DSPE-PEG₂₀₀₀ ont augmenté d'un facteur d'environ 2 après leur

incubation à 37°C pendant 4 heures dans le DMEM-FCS, alors que les mesures de potentiel ζ sont passées de -1.3 mV à -8.9 mV, après l'incorporation de 25 mol% de DSPE:PEG₂₀₀₀ dans les liposomes DOPE:DOTAP et de -0.52 mV à -5.6 mV après l'incorporation de 50 mol% de DSPE:PEG₂₀₀₀.

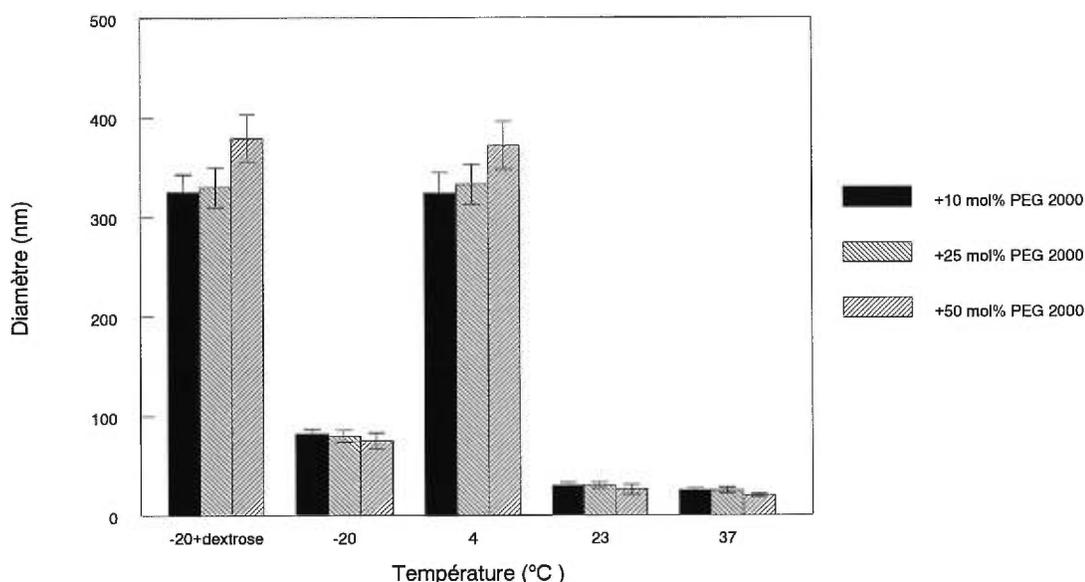


Figure 30: Influence de la température d'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP et des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP, auxquels ont été incorporés initialement 10 mol%, 25 mol% ou 50 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ sur leur diamètre. Étude de thermostabilité des différentes fractions des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ obtenues suite à la séparation par chromatographie d'exclusion stérique des liposomes de leurs micelles sur une colonne de Sépharose 2B. Un ml du lot ayant la plus haute absorbance avec le réactif de Bradford a été incubé à -20°C (avec ou sans 5% de dextrose) 4°C, à 22°C ou à 37°C, pendant 2 mois et remplacé une seconde fois dans la colonne de Sépharose 2B. Le diamètre initial des liposomes "pegylés" est de 325.1 \pm 36.9 nm. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

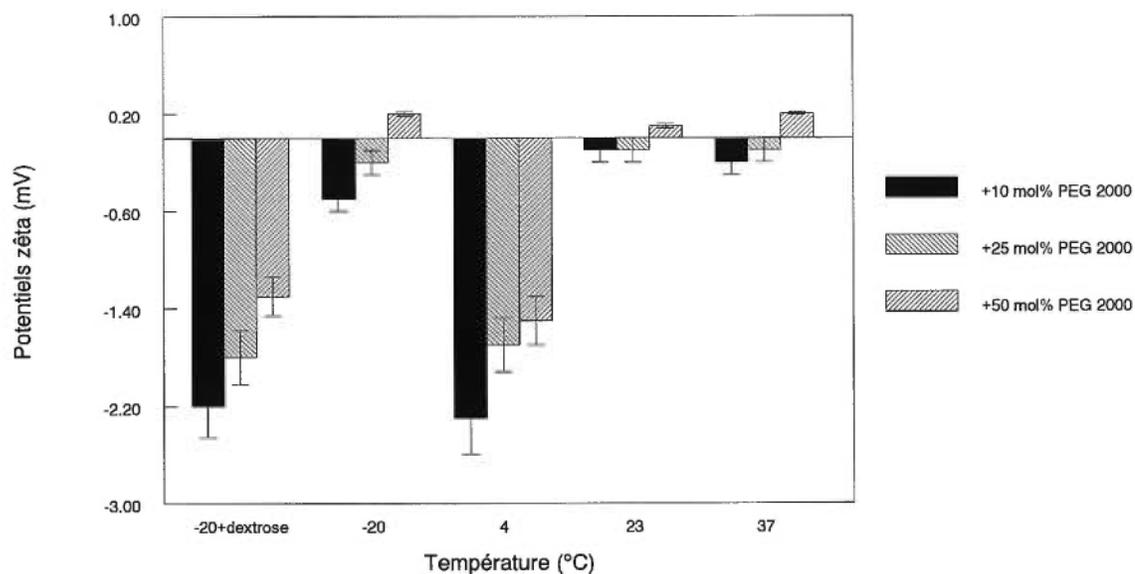


Figure 31: Influence de la température d'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP et des complexes pSV-Gal-DOPE:DOTAP auxquels ont été incorporés initialement 10 mol%, 25 mol% ou 50 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ sur le potentiel ζ . Le potentiel ζ initial des liposomes "pegylés" est de -2.1 ± 0.2 mV. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

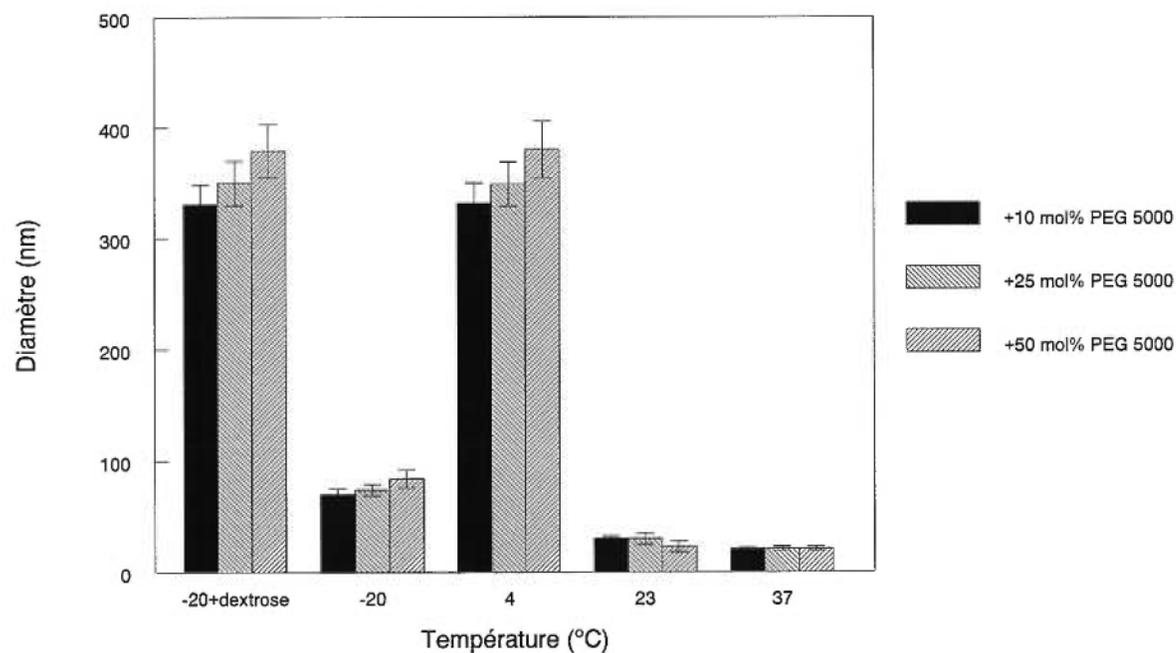


Figure 32 : Influence de la température d'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP et des complexes pSV-Gal-DOPE:DOTAP, auxquels ont été incorporés initialement 10 mol%, 25 mol% ou 50 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀ sur le diamètre. Le diamètre initial des liposomes "pegylés" est de 345.1 ± 37.2 nm. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

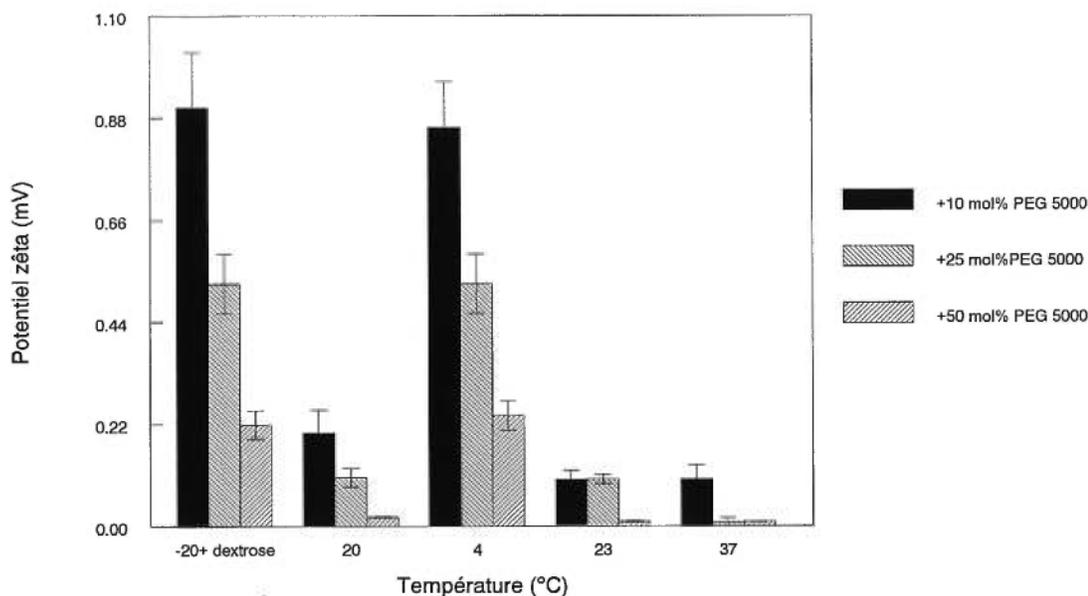


Figure 33: Influence de la température d'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP et des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP, auxquels ont été incorporé initialement 10 mol%, 25 mol% ou 50 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀ sur le potentiel ζ . Le potentiel ζ initial des liposomes "pegylés" est de 0.9 ± 0.1 mV. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

Les figures 30-33 montrent que la stabilité des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ ou pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ maintenus à -20°C en présence de 5% de dextrose et à 4°C pendant 2 mois, n'a pas significativement été modifiée par les conditions de températures imposées, puisqu'en repassant une seconde fois ces complexes dans la colonne de Sépharose 2B, les diamètres et potentiels ζ sont demeurés pratiquement inchangés. Cependant, une diminution d'un facteur d'environ 5 des diamètres et des potentiels ζ de ces complexes a été obtenue, suite à leur entreposage à -20°C sans dextrose. De plus, une diminution d'un facteur d'environ 10 du diamètre et du potentiel ζ des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP "pegylés" a été notée suite à leur entreposage à 22°C ou à 37°C pendant 2 mois.

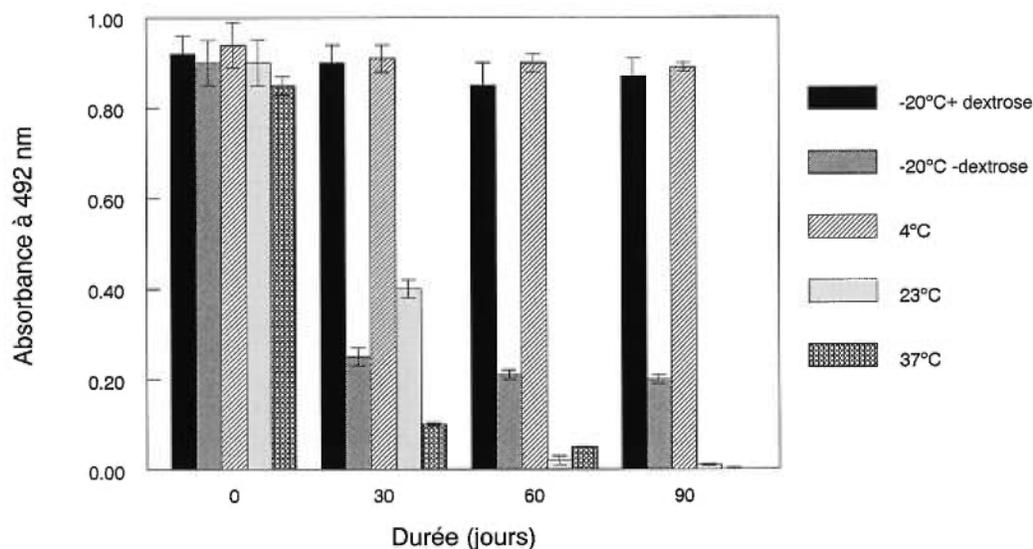


Figure 34: Influence de la température et de la durée d'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP, sur l'expression de la β -Galactosidase dans les cellules Cos-7. Les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP ont été préalablement conservés à -20°C avec ou sans dextrose, à -4°C, à 23°C et à 37°C pendant 90 jours. Les cellules Cos-7 ont été transfectées par 5 μ g de pSV- β -Gal et 50 μ g de liposomes DOPE:DOTAP dans 200 μ l de DMEM-FCS. Les cellules ont été pré-incubées à 37°C avec les complexes pendant 4 heures dans le DMEM, le milieu de culture a ensuite été aspiré, remplacé par du DMEM-FCS, et les cellules ont été incubées pour une période de 48 heures suivi par la détermination de l'expression de la β -Galactosidase. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

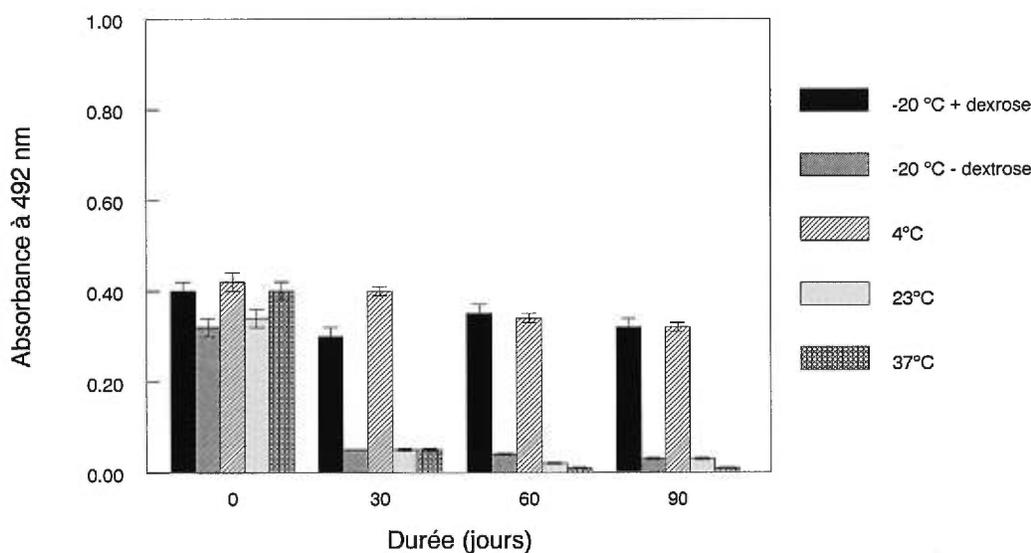


Figure 35: Influence de la température et de la durée d'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP-DSPE:PEG₅₀₀₀ sur l'expression de la β -Galactosidase dans les cellules Cos-7. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

Les figures 34 et 35 démontrent que les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP ou les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP, auxquels ont été incorporés initialement 50 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀ maintenus à des températures d'entreposage de -20°C en présence de 5% de dextrose et de 4°C, ont conservé pendant 90 jours, la totalité de leur activité de transfection dans les cellules Cos-7. Cependant, l'entreposage de ces complexes à -20°C sans dextrose, a engendré une diminution de l'activité de la β -Galactosidase par un facteur d'environ 5. L'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP ou des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP, auxquels ont été incorporés initialement 50 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀ à 22°C et à 37°C, a provoqué une perte totale de l'activité de transfection de ces complexes dans les cellules Cos-7, après 14 jours.

L'influence du SDS sur la stabilité des liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non et sur la rétention liposomale de l'ADN plasmidique a été examinée.

3.3.2. Déoxycholate de sodium (SDS)

Les liposomes cationiques DOPE:DOTAP ont significativement été déstabilisés (réduction de leur diamètre et potentiel ζ) après leur incubation à 23°C en présence de 10 mM de SDS. La présence d'environ 6 mol%, 7 mol% ou 9 mol% de DSPE:PEG₂₀₀₀ ou d'environ 4 mol%, 4.8 mol% ou 5.6 mol% de DSPE:PEG₅₀₀₀ insérés à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP n'a pas résisté complètement à l'action déstabilisante du SDS à 25°C. En effet, une libération d'environ 50% du plasmide pSV- β -Gal incorporé dans les liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ a été observée, comparée à une libération d'environ 30% du plasmide pSV- β -Gal incorporé dans les liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ après 20 minutes d'incubation à 25°C dans le SDS (figures 36 et 37).

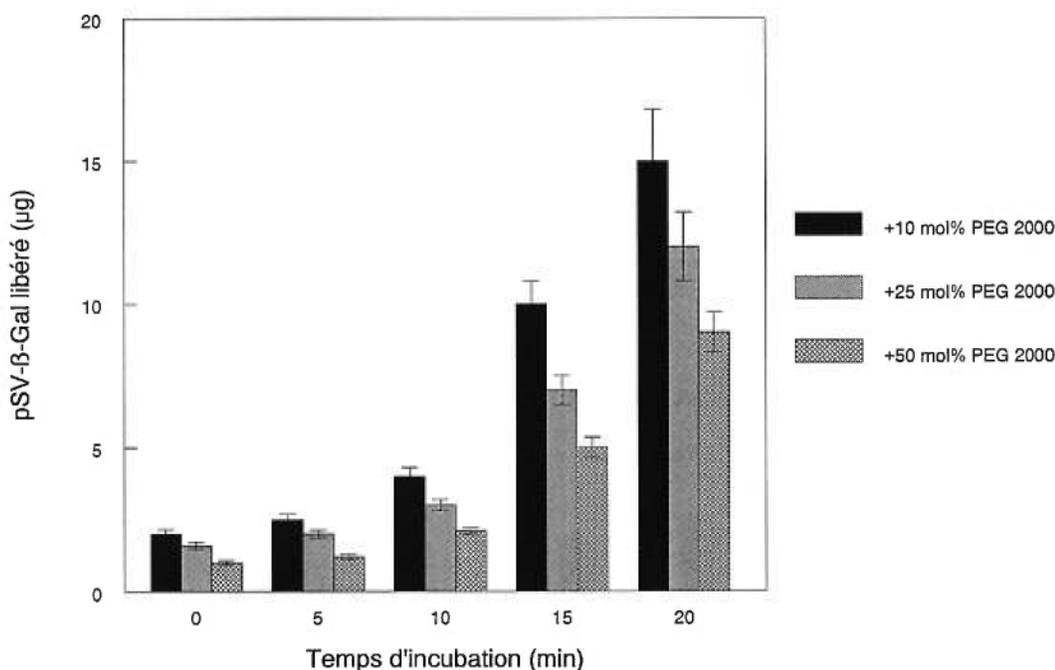


Figure 36: Effet de 10 mM de SDS sur la rétention du plasmide pSV- β -Gal dans les liposomes DOPE:DOTAP, auxquels ont été greffés initialement 10 mol%, 25 mol%, ou 50 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀. Cinquante μ g de plasmide pSV- β -Gal ont été incorporés dans 250 μ g de liposomes DOPE:DOTAP (auxquels ont été greffés 10 mol %, 25 mol % ou 50 mol % de DSPE-PEG₂₀₀₀), et incubés à 37°C pendant 30 minutes. La quantité de plasmide non-incorporée a été éliminée par centrifugation à 13,000g, à température ambiante, pendant 30 minutes suivi de la séparation par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de Sépharose 2B, des liposomes de leurs micelles de DSPE-PEG₂₀₀₀. Les complexes de pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ (sans micelles) ont par la suite été incubés pendant 20 minutes à température ambiante, avec 10 mM de SDS. La quantité d'ADN libérée a été déterminée par analyse spectrofluorimétrique avec le BrEt. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

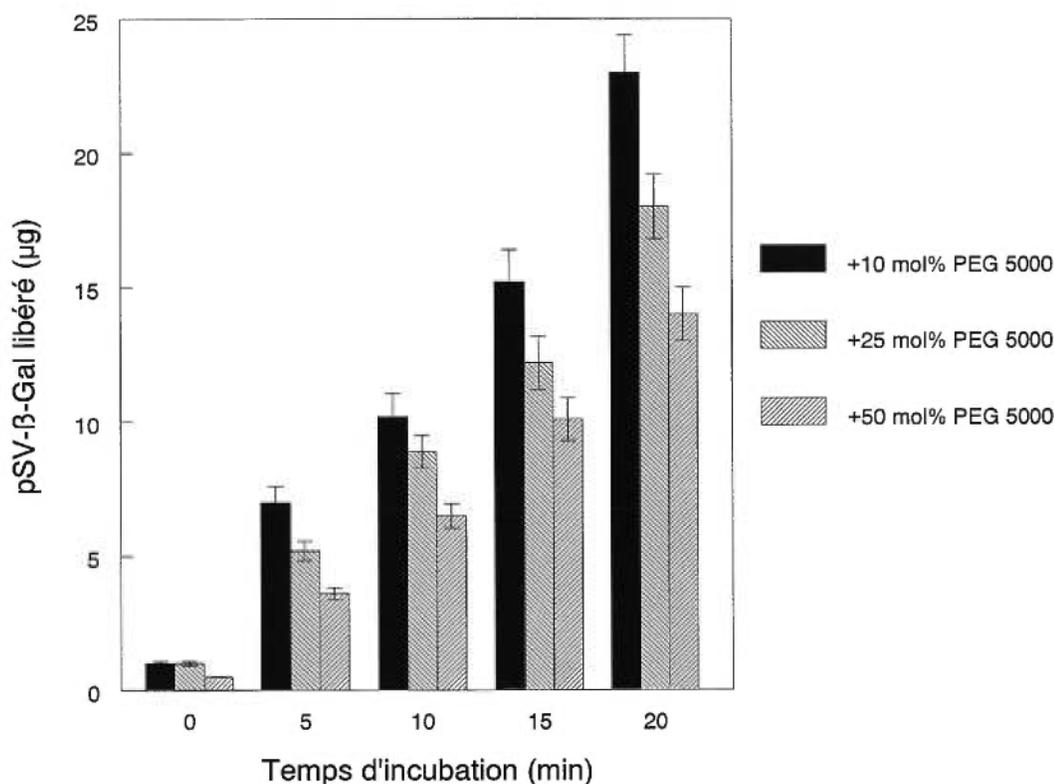


Figure 37: Effet de 10 mM de SDS sur la rétention du plasmide pSV-β-Gal dans les liposomes DOPE:DOTAP, auxquels ont été greffés initialement 10 mol%, 25 mol%, ou 50 mol% de DSPE-PEG₅₀₀₀. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts de trois expériences.

Le chauffage à 37°C pendant 30 minutes de 50 μg de plasmide pSV-β-Gal avec 250 μg de liposomes DOPE:DOTAP, a permis l'incorporation d'environ 24 μg de plasmide pSV-β-Gal. L'incubation du SDS pendant 20 minutes à 23°C avec le plasmide pSV-β-Gal, n'interfère pas avec la fluorescence de la réaction entre le plasmide pSV-β-Gal et le BrEt. Les figures 36 et 37 montrent que la présence d'environ 6 mol%, 7 mol% ou 9 mol% de DSPE:PEG₂₀₀₀ ou d'environ 4 mol%, 4.6 mol% ou 5.6 mol% de DSPE:PEG₅₀₀₀ insérées à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, ne protège pas efficacement les liposomes DOPE:DOTAP de l'action déstabilisante du SDS. Avec environ 6 mol% de DSPE:PEG₂₀₀₀ insérées à la surface des liposomes DOPE:DOTAP, environ 8 μg de plasmide pSV-β-Gal ont été retenus dans les liposomes DOPE:DOTAP-DSPE:PEG₂₀₀₀, sur 24 μg de plasmide pSV-β-Gal incorporés dans ces liposomes. Après insertion de 9 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ à la surface des liposomes

DOPE:DOTAP, environ 16 μg de plasmide pSV- β -Gal ont été retenus. Avec les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE:PEG₅₀₀₀, l'insertion de 4 mol%, 4.8 mol% ou de 5.6 mol% de DSPE:PEG₅₀₀₀ à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, les quantités de plasmide pSV- β -Gal retenues par ces liposomes sont respectivement de 3 μg , 8 μg et 12 μg .

En vue d'élucider les effets des lipoprotéines HDL, LDL et VLDL sur la stabilité des porteurs liposomaux d'ADN, a été évaluée en terme des changements de diamètre et de potentiel ζ des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP.

3.3.3. Lipoprotéines humaines

L'interaction à 37°C des liposomes cationiques DOPE:DOTAP ou des liposomes DOPE:DOTAP-DSPE:PEG₂₀₀₀ ou DOPE:DOTAP-DSPE:PEG₅₀₀₀ avec les HDL s'est traduite par la solubilisation des liposomes DOPE:DOTAP et de leurs formes "pegylées". Les liposomes DOPE:DOTAP-DSPE:PEG₂₀₀₀ et DOPE:DOTAP-DSPE:PEG₅₀₀₀ protègent environ 2 fois plus les liposomes DOPE:DOTAP de leur solubilisation par les HDL. Aucun changement significatif du diamètre et du potentiel ζ a été observé lors de l'incubation des liposomes anioniques DOPE:DMPG avec les HDL (figures 38-43).

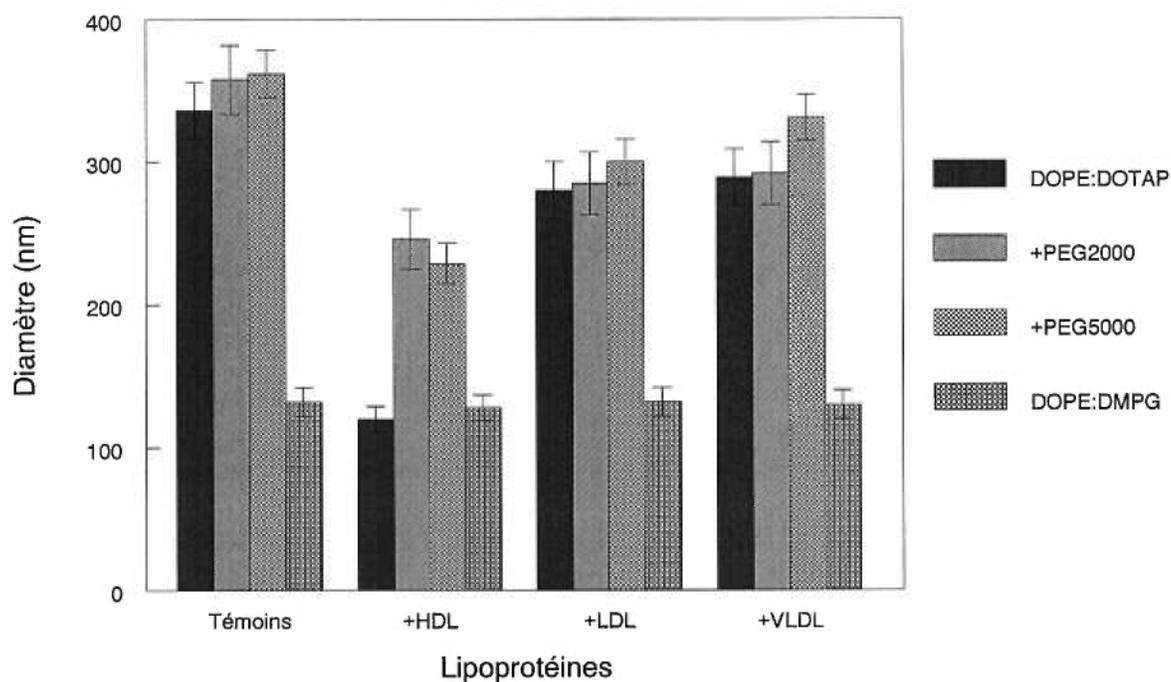


Figure 38: Effet des lipoprotéines plasmatiques humaines HDL, LDL ou VLDL sur les diamètres (agrégation) des liposomes cationiques DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, et des liposomes anioniques DOPE:DMPG. Les diamètres des liposomes cationiques DOPE:DOTAP (250 µg/ml), auxquels ont été greffés initialement 50 mol% de DSPE:PEG₂₀₀₀ ou de DSPE:PEG₅₀₀₀ et des liposomes anioniques DOPE:DMPG (250 µg/ml), ont été déterminés après leur incubation à 37°C pendant 5 minutes avec 500 µg/ml de chacune des lipoprotéines du plasma sanguin humain HDL, LDL, VLDL. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

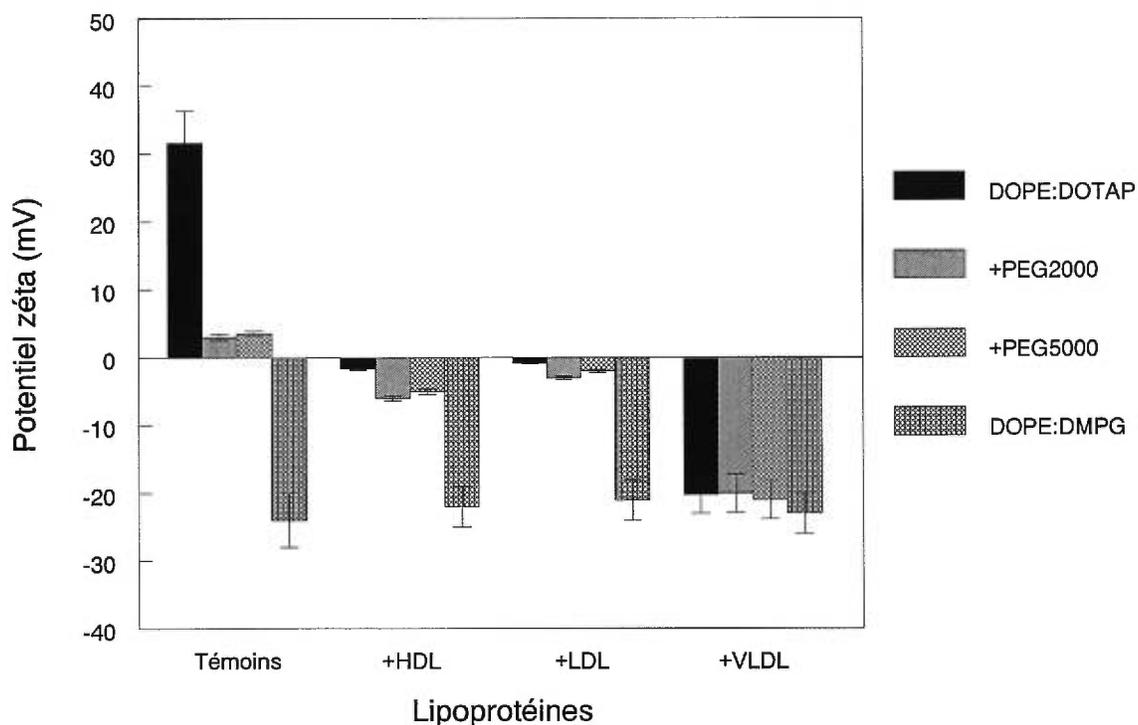


Figure 39: Potentiel ζ des liposomes DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, et des liposomes anioniques DOPE:DMPG, incubés à 37°C, pendant 5 minutes, en présence de 500 $\mu\text{g/ml}$ de lipoprotéines plasmatiques humaines HDL, LDL ou VLDL. Les potentiels ζ des liposomes cationiques DOPE:DOTAP (250 $\mu\text{g/ml}$), auxquels ont été greffés initialement 50 mol% de DSPE:PEG₂₀₀₀ ou DSPE:PEG₅₀₀₀ et des liposomes anioniques DOPE:DMPG (250 $\mu\text{g/ml}$), ont été déterminés après leur incubation à 37°C pendant 5 minutes avec 500 $\mu\text{g/ml}$ de chacune des lipoprotéines du plasma sanguin humain HDL, LDL, VLDL. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

Les figures 38 et 39 illustrent que les liposomes cationiques DOPE:DOTAP sont fortement déstabilisés en présence des lipoprotéines du plasma sanguin humain HDL en terme de leur diamètre (réduction de leur taille de ≈ 320 nm à ≈ 120 nm) et de leur potentiel ζ (+31.6 mV à +1.2 mV). Les liposomes DOPE:DOTAP, auxquels ont été greffés à la surface initialement 50 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de DSPE-PEG₅₀₀₀, protègent environ 2 fois plus les liposomes DOPE:DOTAP de leur déstabilisation par les lipoprotéines HDL. Aucun changement significatif de diamètre et de potentiel ζ des liposomes anioniques DOPE:DMPG, n'a été observé suite à l'incubation des liposomes anioniques DOPE:DMPG en présence des lipoprotéines humaines HDL, LDL ou VLDL.

(132 nm de diamètre et -20.2 mV de potentiel ζ comparés à 129 nm et -24 mV avec HDL).

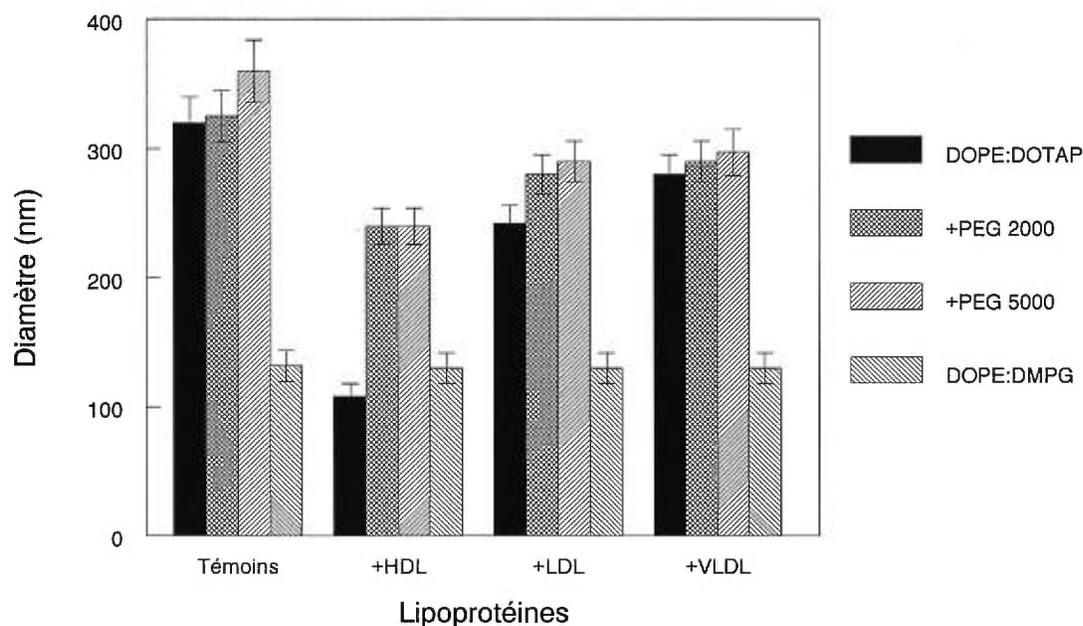


Figure 40: Influence des lipoprotéines plasmatiques humaines HDL, LDL ou VLDL sur les diamètres (agrégation) des complexes pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP et pSV-β-Gal-DOPE:DMPG à 37°C. Les liposomes cationiques DOPE:DOTAP (250 μg/ml) auxquels ont été greffés initialement 50 mol% de de DSPE:PEG₂₀₀₀ ou DSPE:PEG₅₀₀₀ ont été incubés avec 25 μg/ml de plasmide pSV-β-Gal à 37°C, pendant 30 minutes. Afin de se débarrasser de l'ADN non-incorporé, les complexes pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP ont été incubés à 37°C, pendant 1 heure, avec 80 unités de DNase I, suivi de l'inactivation de l'enzyme. Le plasmide pSV-β-Gal (50 μg/ml) a été incorporé dans les liposomes anioniques DOPE:DMPG (250 μg/ml) par la technique de déshydratation et hydratation. Les changements de diamètre (agrégation) des liposomes ont été mesurés suite à l'incubation à 37°C pendant 5 minutes des complexes pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP "pegylés" ou non et des complexes pSV-β-Gal-DOPE:DMPG avec une concentration physiologique de 500 μg/ml de HDL, LDL ou VLDL. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences.

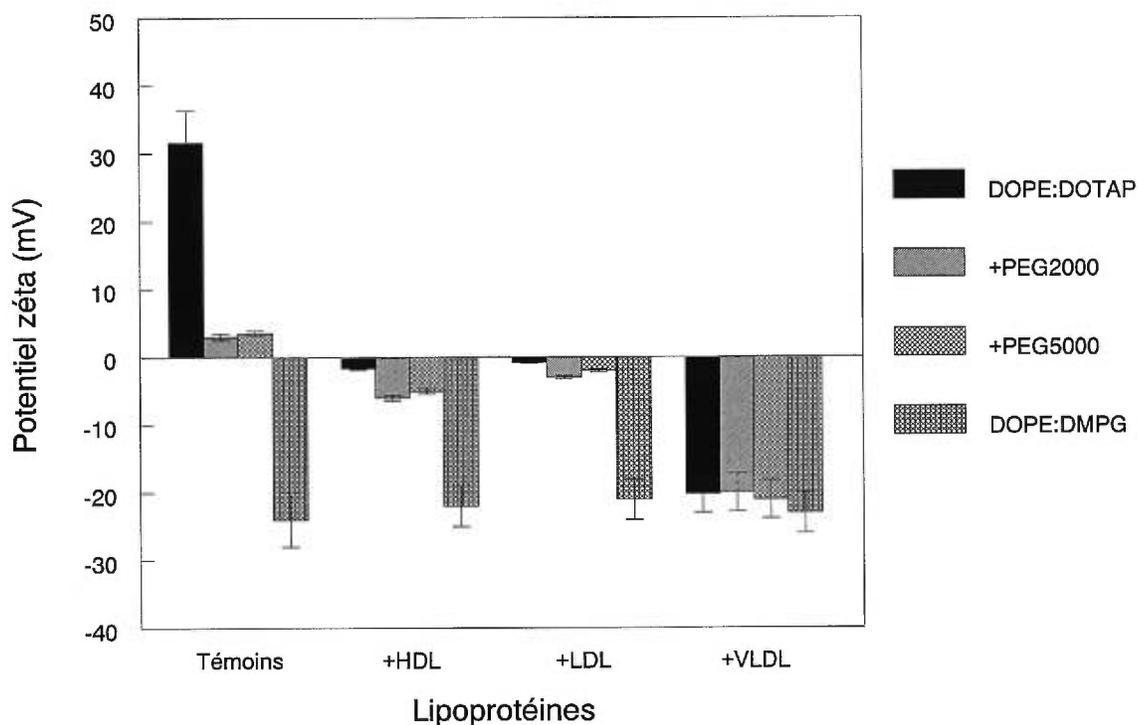


Figure 41: Influence des lipoprotéines plasmatiques humaines HDL, LDL ou VLDL sur les potentiels ζ des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP ou pSV- β -Gal-DOPE:DMPG. Les changements de potentiels ζ ont été mesurés suite à l'incubation à 37°C, pendant 5 minutes, des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP pegylés ou non et des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DMPG avec une concentration physiologique de 500 μ g/ml de HDL, LDL ou VLDL. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types de trois expériences.

Les figures 40, 41 démontrent que la stabilité des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE:PEG₂₀₀₀ ou pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE:PEG₅₀₀₀ en terme de l'agrégation des liposomes et de leur potentiel ζ , suite à l'incubation de ces complexes à 37°C avec les lipoprotéines HDL, LDL ou VLDL, est comparable à celle obtenue avec les liposomes DOPE:DOTAP:DSPE:PEG₂₀₀₀ ou les liposomes DOPE:DOTAP:DSPE:PEG₅₀₀₀ sans plasmide pSV- β -Gal.

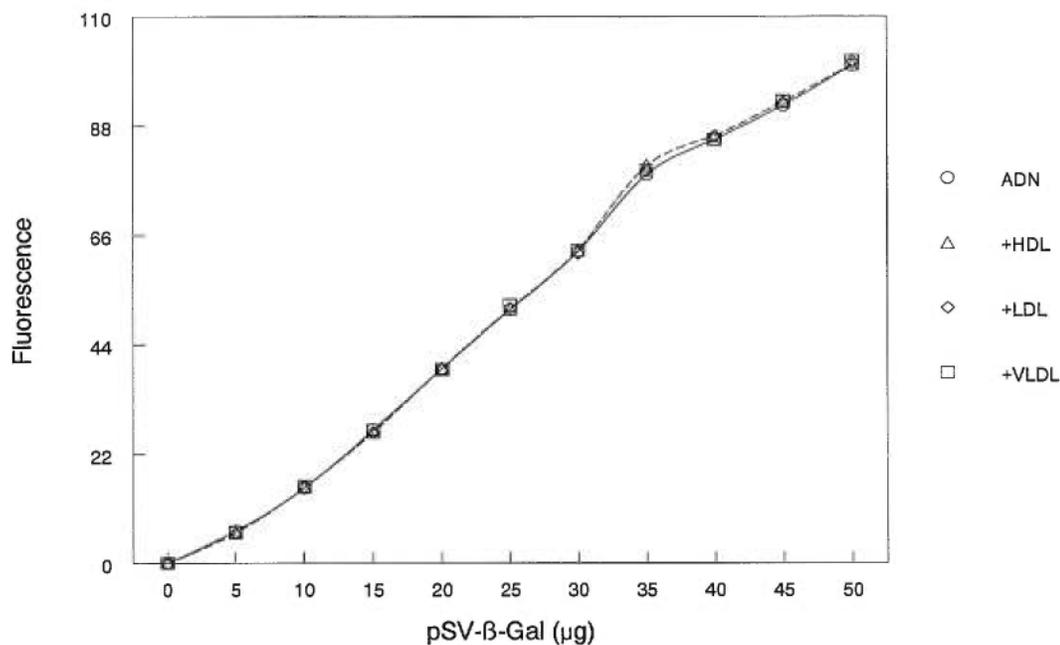


Figure 42: Courbe de calibration du plasmide pSV-β-Gal incubé à 37°C, avec 500 μg/ml de lipoprotéines plasmatiques humaines HDL, LDL ou VLDL. Effet de l'incubation à 37°C pendant 5 minutes du plasmide pSV-β-Gal avec 500 μg/ml de HDL, LDL ou LDL, sur la liaison pSV-β-Gal-BrEt (concentration finale 5 μg/ml). Les fluorescences ont été déterminées par analyse spectrofluorimétrique en présence du BrEt. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de cinq expériences.

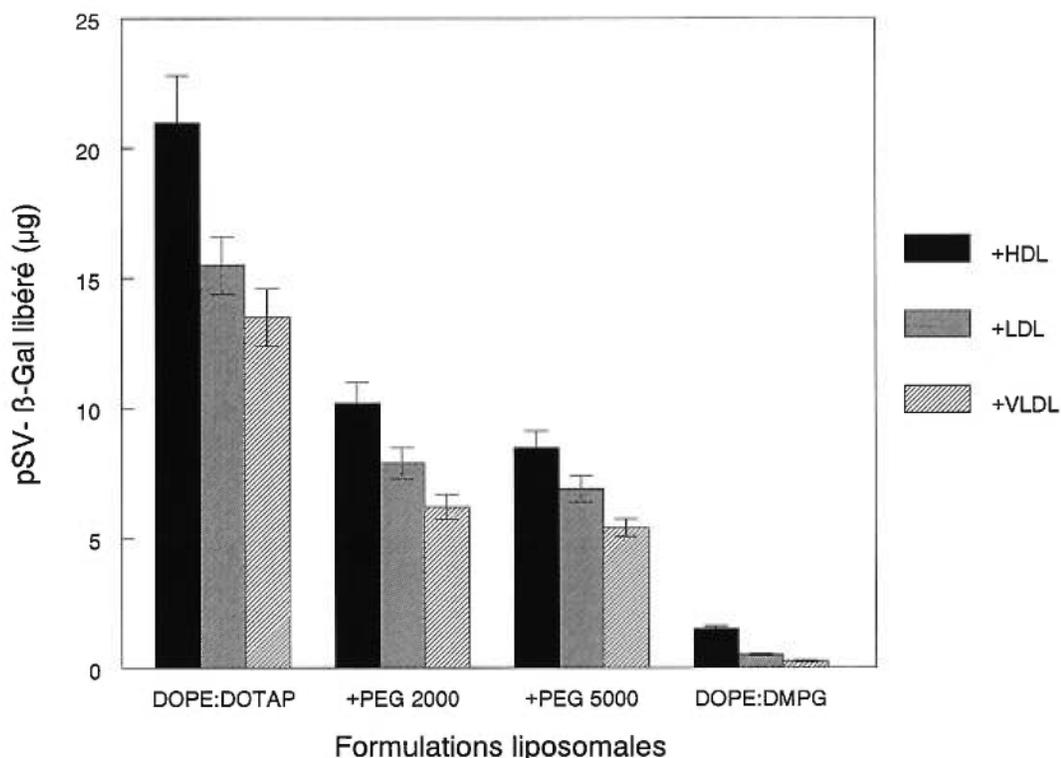


Figure 43: Influence des lipoprotéines plasmatiques humaines HDL, LDL ou VLDL sur la libération du plasmide pSV-β-Gal, incorporé dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP “pegylés” ou non, ou dans les liposomes anioniques DOPE:DMPG. La libération d’ADN des complexes pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP “pegylés” ou des complexes pSV-β-Gal-DOPE:DMPG a été évaluée par analyse spectrofluorimétrique avec le BrEt après l’incubation de ces complexes à 37°C pendant 60 minutes avec 500 μg/ml de HDL, LDL ou de VLDL. Les valeurs sont les moyennes ± les écarts types de trois expériences

La figure 42 montre que l’incubation des lipoprotéines du plasma sanguin humain HDL, LDL ou VLDL avec le plasmide pSV-β-Gal à 37°C pendant 5 minutes, n’interfère pas avec les mesures de fluorescence de la réaction entre le plasmide pSV-β-Gal et le BrEt. La figure 43 indique que les quantités de plasmide pSV-β-Gal libérées des liposomes DOPE:DOTAP “pegylés” ou non en présence des lipoprotéines humaines HDL, sont toujours plus élevées que celles obtenues avec les autres lipoprotéines de plus faible densité, LDL ou VLDL. Suite à l’incubation des complexes pSV-β-Gal-DOPE:DOTAP avec les lipoprotéines humaines HDL, environ 22 μg sur 24 μg de la quantité de plasmide incorporés dans les liposomes DOPE:DOTAP, ont été libérés de ces liposomes. De plus, environ 5 μg et 4 μg de plasmide pSV-β-Gal incorporés

respectivement dans les liposomes DOPE:DOTAP:DSPE:PEG₂₀₀₀ et DOPE:DOTAP:DSPE:PEG₅₀₀₀ ont été libérés de ces liposomes. Après l'incubation à 37°C des liposomes cationiques DOPE:DOTAP (auxquels ont été incorporés initialement à la surface 50 mol% de DSPE:PEG₂₀₀₀ ou de DSPE:PEG₅₀₀₀), environ 5 fois plus de plasmide pSV-β-Gal ont été retenus par les liposomes "pegylés", comparée à la quantité de plasmide retenue par les liposomes DOPE:DOTAP. Suite à l'incubation des liposomes anioniques DOPE:DMPG avec HDL, environ 2 µg de plasmide pSV-β-Gal incorporés ont été libérés de ces liposomes anioniques.

4. DISCUSSION

4.1. Étude préliminaire des interactions acides nucléiques-liposomes cationiques

4.1.1. Caractérisation des complexes ADN:DOPE:DOTAP

D'après le tableau 2, une baisse importante du diamètre de l'ADN génomique de sperme de saumon a été observée après l'ajout des liposomes cationiques DOPE:DOTAP (5 μm à 1.2 μm pour un rapport de masse liposomes:ADN de 1:1). Les lipides cationiques facilitent probablement le resserrement de l'ADN, via des interactions ioniques entre les lipides cationiques et l'ADN. Ceci est sans doute à l'origine de la formation d'un complexe ADN-lipides cationiques qui contient plusieurs plasmides liés par des liaisons hydrophobes avec les lipides cationiques [150].

Un autre modèle hypothétique suggère que l'interaction électrostatique de l'ADN avec les lipides cationiques favoriserait l'insertion et le resserrement en boule de l'ADN entre les bicouches de lipides cationiques, résultant en la formation d'une structure multilamellaire, condensée et ordonnée [183]. En effet, l'ADN induirait la fusion des lipides cationiques en bicouches lipidiques plus allongées, entre lesquelles l'ADN pourrait s'insérer en "sandwich". Ceci serait accompagnée par une condensation ou un resserrement de l'ADN en boule. Behr a été le premier à démontrer le resserrement de l'ADN et son recouvrement par les lipides cationiques synthétiques [150]. La force motrice d'auto-assemblage de ces structures multilamellaires, condensées et ordonnées, pourrait être due à la libération de contre-ions. En effet, l'ADN contient 20 groupes phosphate par pas hélicoïdal de 34.1 Å, et due à la condensation de Manning, 76% des groupements anioniques sont neutralisés de façon permanente par leurs contre-ions. Ainsi, durant le resserrement de l'ADN, les lipides cationiques neutraliseraient les groupes phosphate de l'ADN, favorisant le remplacement et la libération des contre-ions initialement condensés [151].

Ainsi, les résultats du tableau 2 suggèrent qu'en changeant de façon appropriée les quantités de lipides cationiques, le diamètre et la charge de surface (potentiel ζ) des

complexes ADN-lipides cationiques varient, de façon à optimiser le recouvrement de la charge initiale des liposomes cationiques ainsi que l'efficacité de livraison et d'expression de l'ADN dans un type cellulaire donné.

Des études de diffraction aux rayons X, de fluorescence et de microscopie électronique et optique, sont en cours en vue de tenter d'élucider la structure et la fonction des complexes ADN-lipides cationiques [178]. L'environnement ionique unique conféré par la membrane lipidique est susceptible d'avoir des effets importants sur la structure et la fonction ultime des complexes ADN-lipides cationiques [148].

4.1.2. Incorporation des dérivés de PEG (RMN ^1H)

Les études en RMN ^1H (figures 1-3) ont permis de déterminer la quantité de DSPE:PEG insérée à la surface des liposomes DOPE:DOTAP. À mesure que la concentration initiale des dérivés de DSPE-PEG à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP a été augmentée, la quantité de PEG insérée à la surface des liposomes DOPE:DOTAP a été accrue, mais très peu par rapport à la quantité de PEG ajouté initialement (figures 1-3). Ceci pourrait s'expliquer par une saturation très rapide des sites d'insertion de PEG à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP. De plus, environ 2 fois moins de DSPE-PEG₅₀₀₀ ont été insérés au sein des bicouches phospholipidiques des liposomes DOPE:DOTAP, comparée à la quantité insérée de DSPE-PEG₂₀₀₀. À cause de la densité plus élevée de l'enrobage des chaînes de DSPE-PEG₅₀₀₀ ainsi que de la rapidité avec laquelle les chaînes de DSPE-PEG₅₀₀₀ changent de conformations, ces dernières s'avèrent moins insérées à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, que les chaînes de DSPE-PEG₂₀₀₀ [203].

4.1.3. Effet de la concentration des liposomes cationiques sur l'incorporation des acides nucléiques dans ces liposomes

La figure 4 montre que l'augmentation de la concentration de liposomes cationiques DOPE:DOTAP, particulièrement à des rapports de masse ADN:(DOPE:DOTAP) \geq à 1:5, favorise grandement l'interaction électrostatique entre l'ADN et les liposomes

cationiques. L'interaction entre la charge positive des complexes ADN-DOPE:DOTAP et la charge positive du BrEt n'est pas favorable [204].

4.2. Influence du chauffage sur l'incorporation des acides nucléiques dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP

4.2.1. Effet de l'élévation de la température de chauffage sur l'incorporation des acides nucléiques dans les liposomes cationiques

L'élévation de la température de chauffage des complexes acides nucléiques-DOPE:DOTAP "pegylés" ou non (de 37°C à 85°C), s'est traduite par une augmentation significative de l'incorporation de l'ADN génomique de sperme de saumon, de l'ARN de levure et du plasmide pBR322 dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP (figures 6-11).

L'incorporation des acides nucléiques dans les liposomes cationiques est en rapport avec les caractéristiques des membranes phospholipidiques [16, 17]. Les PL sont des structures très labiles en fonction des contraintes et présentes une grande liberté de mouvement dynamique au sein des liposomes [18]. La fluidité membranaire est influencée à la fois par la nature des acides gras (leur nombre de carbones, la présence ou non d'insaturations et leur conformation cis ou trans), ainsi que la nature du groupe de tête.

L'insaturation en position 9 cis du dioléoyle de la DOPE, confère une température membranaire de transition de phase très faible de -20°C. La DOPE s'avère donc très fluide à une température de 37°C. La PE présente une plus petite tête polaire que la PC, et la présence d'atomes d'hydrogène directement attachés à l'azote de la fonction éthanolamine, faciliterait probablement les interactions avec des molécules adjacentes qui siègent dans la membrane. Le DSPE présente un T_m de 63°C, cette dernière est plus rigide à température ambiante. Les figures 6-8, 10 et 11 suggèrent que le chauffage des complexes ADN-DOPE:DOTAP contribue à accentuer le phénomène de transition de phase de la forme cristalline des PL des liposomes DOPE:DOTAP, à une forme plus fluide-liquide, plus désordonnée et plus perméable [205] facilitant ainsi la diffusion de l'ADN neutralisé par l'excès de charges positives des lipides cationiques, dans les liposomes cationiques.

Ainsi, l'incorporation des acides nucléiques dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP est étroitement reliée à la fluidité membranaire des PL constituant les liposomes. L'augmentation de la fluidité membranaire des liposomes cationiques favorise l'incorporation des acides nucléiques dans les liposomes cationiques.

4.2.2. Influence du matériel génétique sur l'incorporation des acides nucléiques dans les liposomes cationiques

Les figures 6-8 démontrent qu'environ 2 fois plus d'ADN génomique de sperme de saumon ont été incorporés dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP, comparée à l'incorporation de l'ARN de levure. Ceci pourrait s'expliquer notamment par la taille et la composition de l'ARN de levure. L'ARN de levure possède un diamètre correspondant au double de celui de l'ADN génomique de sperme de saumon, soit d'environ 10,000 nm. De plus, l'ARN de levure est un mélange principalement formé d'ARN ribosomal, d'une moins grande proportion d'ARN messager non-fonctionnel, ainsi que d'un plus grand nombre de structures secondaires et tertiaires que l'ADN génomique de sperme de saumon.

À cause notamment de la petite taille du double brin de plasmide pBR322 (4363 pB) et de sa structure plus compacte, le plasmide pBR322 s'incorpore plus facilement au sein des bicouches phospholipidiques, que l'ADN génomique de sperme de saumon ou l'ARN de levure (figures 6-8). Les figures 10 et 11 révèlent que la linéarisation du plasmide pBR322 semble faciliter son insertion entre les chaînes de PEG et son incorporation dans les liposomes DOPE:DOTAP. Des études suggèrent qu'à cause du caractère linéaire des molécules d'ADN, celui-ci interagit avec les lipides cationiques à la surface des liposomes en s'insérant entre les chaînes de PEG [83]. De plus, le plasmide pBR322 linéarisé résiste davantage à la digestion par l'endonucléase de pancréas bovine, la DNase I (résultats non présentés). Ainsi, la structure linéaire du plasmide pBR322 favoriserait davantage son interaction avec les dérivés de DSPE-PEG et son incorporation au sein des liposomes DOPE:DOTAP. Le plasmide sous sa forme

circulaire aurait plus tendance à être mobile entre les chaînes de PEG, à s'échapper des liposomes DOPE:DOTAP et à être davantage exposé aux nucléases.

Il est à noter que l'ADN est incorporé par chauffage dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP, et non pas simplement fixés à la surface de ces liposomes, puisque les mesures de potentiel ζ des liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non, demeurent inchangées en présence de l'ADN (tableau 6).

4.2.2.1. Influence des dérivés de PEG sur l'incorporation de l'ADN dans les liposomes cationiques

À mesure que la densité d'enrobage de PEG augmente à la surface des liposomes DOPE:DOTAP (PEG d'unités d'éthylène glycol 900, 2000 ou 5000), la quantité d'ADN incorporée dans les liposomes DOPE:DOTAP diminue (figures 6-8, 10 et 11). La présence d'une couche protectrice hydrophile de densité suffisamment élevée de PEG à la surface des liposomes cationiques exerce une forme de "barrière stérique" [206] limitant l'interaction électrostatique spontanée entre l'ADN et les liposomes cationiques DOPE:DOTAP. Le DSPE-PEG₅₀₀₀ (100 unités de monomères d'éthylène glycol comparées à 44 pour le DSPE-PEG₂₀₀₀) présente une plus grande densité d'enrobage autour des liposomes DOPE:DOTAP et confère une plus grande rigidité aux chaînes lipidiques des liposomes DOPE:DOTAP, minimisant davantage les interactions entre les liposomes DOPE:DOTAP et les acides nucléiques [207].

De plus, le PEG adopte une conformation similaire à une "brosse" à la surface des liposomes, qui restreint les interactions non-spécifiques des liposomes avec différentes molécules [208]. La présence d'une couche de PEG à la surface des liposomes augmente l'énergie d'activation des réactions entre les liposomes et diverses molécules, réduisant ainsi la probabilité d'interaction des liposomes avec d'autres constituants [86].

L'effet de "barrière stérique" exercé par les dérivés de DSPE-PEG à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP est cependant moins prononcé à mesure que nous élevons la température de chauffage des complexes pBR322-liposomes cationiques

(figures 6-8, 10 et 11). La fluidité et la flexibilité accrues des chaînes lipidiques des liposomes DOPE:DOTAP qui résultent de l'élévation de la température de formation des complexes ADN-DOPE:DOTAP, faciliteraient davantage la diffusion de l'ADN neutralisé par l'excès de lipides cationiques au sein des bicouches phospholipidiques. De plus, le tableau 6 démontre que la présence du DSPE-PEG₂₀₀₀ à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, augmente le rayon de solvation des liposomes et réduit significativement la charge à la surface des liposomes DOPE:DOTAP tout en permettant à ces liposomes de réagir avec l'ADN plasmidique.

Mais, qu'en est-il de la rétention de l'ADN incorporé par chauffage dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non et de l'activité biologique de l'ADN au sein des bactéries *E. coli* ou des cellules de mammifères Cos-7?

4.3. Effet du chauffage sur l'expression de l'ADN liposomal dans les bactéries *E. coli*

4.3.1. Insertion du plasmide pBR322 précipité au chlorure de calcium ou des complexes pBR322-DOPE:DOTAP dans les bactéries *E. coli*

Le plasmide pBR322 possède deux régions codantes, une réservée à l'expression d'une résistance à l'ampicilline (un antibiotique qui inhibe la formation des peptidoglycanes) et une autre, réservée à l'expression d'une résistance à la tétracycline (un antibiotique qui inhibe la synthèse des protéines).

Le tableau 4 indique clairement que l'introduction du plasmide pBR322 dans les bactéries *E. coli* ne modifie pas la croissance normale des bactéries. L'activité du plasmide pBR322 précipité au CaCl₂ et introduit dans les bactéries *E. coli* a été confirmée par la capacité de ce plasmide de conférer aux bactéries l'expression d'une résistance à l'ampicilline et à la tétracycline. Le plasmide pBR322 linéarisé n'a pas conféré aux bactéries l'expression de la résistance à la tétracycline. En effet, lors de la procédure de linéarisation du plasmide pBR322, le gène codant pour l'expression d'une

résistance à la tétracycline a été clivé. Ainsi, le plasmide pBR322 linéarisé s'est avéré actif au sein des bactéries *E. coli*, car il a conféré aux bactéries l'expression d'une résistance à l'ampicilline.

Les complexes pBR322-DOPE:DOTAP formés par chauffage à 85°C ont conféré aux bactéries *E. coli* des pourcentages de résistance à l'ampicilline, plus élevés que ceux obtenus avec les complexes pBR322-DOPE:DOTAP "pegylés" et considérablement plus élevés que ceux obtenus après la précipitation du plasmide pBR322 au CaCl₂ dans les bactéries *E. coli* (figures 12, 13, 16-20).

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les liposomes cationiques DOPE:DOTAP augmentent l'activité du plasmide pBR322, parce qu'ils assurent une meilleure protection de l'intégrité du plasmide pBR322 de sa dégradation par les nucléases intracellulaires ou extracellulaires [204] ainsi qu'une meilleure vectorisation du plasmide dans les bactéries *E. coli* probablement due à une interaction électrostatique plus favorable des complexes pBR322-DOPE:DOTAP de charge nette positive, avec les bactéries *E. coli* [209].

De plus, la présence de PEG incorporé au moment de la préparation des liposomes DOPE:DOTAP, exerce une forme de "barrière stérique" [206-208], limitant par la suite l'incorporation du plasmide au sein de ces liposomes. Il y a aussi probablement une interaction et une fusion moins favorables des complexes pBR322-DOPE:DOTAP "pegylés" avec les bactéries *E. coli*, à cause de l'effet de "barrière stérique" exercé par les dérivés de PEG (se référer à la section 4.2.2.1). Il est également plausible qu'une certaine quantité de plasmide pBR322 soit "séquestrée" entre les chaînes de PEG présentes à la surface des liposomes DOPE:DOTAP et soit par conséquent davantage exposée aux nucléases. L'activité de l'ADN, sa livraison et son expression efficaces dans les bactéries *E. coli* seraient alors compromises.

4.4. Effet du chauffage sur l'expression de l'ADN liposomal dans les cellules Cos-7

4.4.1. Transfection du plasmide pSV- β -Gal libre ou liposomal dans les cellules Cos-7

Le chauffage du plasmide pSV- β -Gal à 37°C, 50°C, 65°C et à 85°C a donné lieu à une diminution de l'expression de la β -Galactosidase (figure 21), probablement due à la dénaturation des brins complémentaires de polynucléotides du plasmide pSV- β -Gal. L'ampleur de la dénaturation du plasmide à une température donnée a été mesurée en notant les changements des absorbances UV à 260 nm de la solution d'ADN. L'augmentation des mesures de l'absorbance de l'ADN à 260 nm, a été corrélée avec la séparation des brins de polynucléotides du plasmide pSV- β -Gal. Ainsi, le chauffage du plasmide pSV- β -Gal entraîne la dislocation et la distorsion des brins complémentaires de polynucléotides de la structure native de l'ADN. La séparation des brins complémentaires de l'ADN, déstabilise les structures secondaires de la structure native de l'ADN, compromettant ainsi la stabilité de l'ADN en milieu aqueux. De plus, la sévérité de la dislocation des brins de l'ADN peut être liée à la température de fusion du composé organique pur. Pour le plasmide pSV- β -Gal, la température de fusion est environ 85°C [206].

Les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP incubés pendant 4 heures dans le DMEM des cellules Cos-7, ont assuré une expression de la β -Galactosidase environ 2 fois plus élevée par rapport à celle obtenue avec les liposomes DOPE:DOTAP, auxquels ont été insérés à la surface initialement 10 mol% de micelles de DSPE-PEG₂₀₀₀, et environ 10 fois plus élevée que celle obtenue avec le plasmide pSV- β -Gal précipité au CaPO₄ (figures 24-26).

L'activité accrue du plasmide pSV- β -Gal liposomal dans les cellules Cos-7 pourrait être attribuée à une meilleure protection du plasmide pSV- β -Gal incorporé dans les

liposomes DOPE:DOTAP, de sa dégradation enzymatique par les nucléases intracellulaires ou celles contenues dans le DMEM-FCS [206], ainsi qu'à la vectorisation du plasmide pSV- β -Gal au moyen des porteurs liposomaux dans les cellules Cos-7.

De plus, une interaction électrostatique plus favorable entre les charges antagonistes des liposomes cationiques et des cellules Cos-7 pourrait favoriser l'activité du plasmide pSV- β -Gal. En effet, la présence d'une charge nette positive à la surface des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP, faciliterait l'interaction spontanée avec les membranes biologiques chargées négativement [210].

Les complexes pSV-40- β -Gal-DOPE:DOTAP "pegylés" ont été 2 fois moins efficaces pour assurer l'expression de la β -Galactosidase au sein des cellules Cos-7, comparés aux complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP. Ceci pourrait s'expliquer par une forme possible de "séquestration" du plasmide pSV-40- β -Gal dans le "nuage" de micelles de PEG, limitant la livraison et l'expression efficace du plasmide pSV- β -Gal au sein des cellules Cos-7. Ainsi, la quantité de plasmide pSV- β -Gal retenue dans les micelles de PEG, ne serait pas accessible au BrEt, ceci pourrait expliquer les quantités comparables de plasmide pSV- β -Gal incorporées dans les liposomes DOPE:DOTAP et dans les liposomes DOPE:DOTAP, auxquels ont été insérés 10 mol% de micelles de DSPE-PEG₂₀₀₀ (tableau 5).

Une étude récente a démontré que l'ajout de concentrations croissantes de PEG à différentes formulations de lipides cationiques-ADN, a un effet inhibiteur sur l'activité de transfection de ces formulations [123]. Cette étude indique que le(s) mécanisme(s) détaillé(s) des effets du PEG sur la transfection de plasmide et sur l'activité des complexes plasmide-liposomes, ne sont pas encore connus.

D'autres études de mobilités électrophorétiques révèlent que les liposomes cationiques contenant les dérivés de DSPE-PEG ont des mobilités réduites comparées aux liposomes

sans PEG. Ceci pourrait être attribué à l'augmentation de la force hydrodynamique des chaînes de polymères, adoptant une conformation de "brosse" à la surface des liposomes [211]. Ainsi, cette baisse de mobilités des liposomes cationiques contenant les dérivés de DSPE-PEG, pourrait compromettre la vectorisation et l'expression d'un plasmide au sein d'un type cellulaire donné.

De plus, à cause de l'effet de "barrière stérique" [206-208] des dérivés de PEG, l'interaction et l'endocytose des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ par les cellules Cos-7 seraient moins favorables.

4.4.2. Influence des conditions expérimentales

Le rapport molaire des complexes ADN-liposomes cationiques, la quantité de complexe ajoutée, la durée d'exposition des complexes avec les cellules, ainsi que la composition du milieu de transfection (présence ou absence de sérum), sont des facteurs qui ont été examinés afin d'optimiser l'efficacité de transfection *in vitro*.

L'efficacité de transfection du plasmide pSV- β -Gal dans les cellules Cos-7 par les méthodes de précipitation au CaPO₄ ou de lipofection, s'est avérée dépendante de la quantité de plasmide pSV- β -Gal précipitée au CaPO₄ ou incorporée dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP [174]. À même concentration de plasmide pSV- β -Gal, le plasmide incorporé dans les liposomes DOPE:DOTAP confère des activités de la β -Galactosidase environ 10 fois supérieures à celles obtenues avec le plasmide précipité au CaPO₄ pour les raisons mentionnées dans la section 4.4.1 (figures 22-24).

La concentration de liposomes cationiques DOPE:DOTAP [174], la durée de pré-incubation du plasmide pSV- β -Gal ou des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP "pegylés" ou non, avec les cellules Cos-7, ainsi que la composition du milieu de pré-incubation, affectent l'efficacité de transfection [175]. En général, une augmentation de la concentration des liposomes améliore la transfection du plasmide pSV- β -Gal au sein des cellules Cos-7 (figures 24-26). Cependant, à une concentration de 50 μ g de liposomes cationiques DOPE:DOTAP, jusqu'à 70% de toxicité dans les cellules Cos-7 a

été observée (figures 27 et 28). Certaines études indiquent que la toxicité des liposomes est reliée à l'excès de lipides non-complexés et la séparation des complexes ADN-lipides des lipides non-complexés par centrifugation, diminuerait significativement la cytotoxicité [130].

À mesure que la concentration du plasmide pSV- β -Gal augmente dans les cellules Cos-7, l'activité du plasmide diminue et la cytotoxicité augmente (figures 21-23). L'intégrité et l'activité du plasmide pSV- β -Gal ont sans doute été compromises par sa digestion par les nucléases intracellulaires ou extracellulaires. L'excès du plasmide pSV- β -Gal a contribué à hausser la cytotoxicité dans les cellules Cos-7 [130].

De façon générale, l'efficacité de transfection augmente avec la durée de pré-incubation des complexes dans le DMEM des cellules Cos-7 (figures 24-26). Cependant, une pré-incubation prolongée (dans notre cas de 24 heures) des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP avec les cellules Cos-7, a engendré des activités de la β -Galactosidase environ 2 fois plus faibles que celles obtenues avec ces complexes pré-incubés pendant 4 heures (figures 25-26).

Il est fort probable que la présence de 10% de sérum de veau présent dans le DMEM des cellules Cos-7, déstabilise les liposomes cationiques DOPE:DOTAP, compromettant la livraison et l'expression efficaces de la β -Galactosidase [206]. Ainsi, des études supplémentaires ont été réalisées afin d'élucider les effets du sérum de veau sur la stabilité des liposomes cationiques DOPE:DOTAP (voir section 4.5).

4.5. Influence de certains constituants de l'environnement biologiques sur la stabilité des porteurs liposomaux d'ADN

4.5.1. Sérum de veau

Le tableau 7 révèle que les liposomes cationiques DOPE:DOTAP se sont fortement agrégés après 4 heures d'incubation à 37°C dans le DMEM-FCS. De plus, l'incubation

des liposomes DOPE:DOTAP à 37°C pour une période de 4 heures dans le DMEM-FCS, a engendré une diminution significative du potentiel ζ liposomal. Clairement, les liposomes cationiques DOPE:DOTAP sont fortement déstabilisés en présence du DMEM-FCS et forment des agrégats. Le sérum de veau contenu dans le DMEM est un mélange de plus d'une centaine de protéines différentes, dont la concentration totale est de 50-70 mg/ml. La plus abondante est l'albumine sérique (30-50 mg/ml), capable de former des ponts entre les liposomes cationiques, résultant en la formation d'agrégats. En effet, le point isoélectrique (CpI) de l'albumine est de 5.5 et à pH 7.4 l'albumine présente une charge négative [211]. Les facteurs de croissance y sont présents à très basse concentration, soient l'hormone de croissance à 34 ng/ml et l'insuline à 0.2 ng/ml [212]. La présence d'agrégats protéines-liposomes cationiques pourrait expliquer la baisse d'un facteur d'environ 2 de l'activité de la β -Galactosidase et de la cytotoxicité accrue [30] des cellules Cos-7 après l'incubation des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP ou pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP-DSPE:PEG₂₀₀₀ à 37°C dans le DMEM contenant 10% de sérum de veau (figures 24-26). Des études ont suggéré que la présence de 3% de sérum de veau dans le milieu cellulaire inactive les complexes ADN-liposomes et inhibe complètement l'expression des gènes [130]. Ces études indiquent également que la toxicité des liposomes est liée à l'excès de lipides non-complexés, et la séparation des complexes ADN-lipides des lipides non-complexés par centrifugation, diminue significativement la cytotoxicité.

L'agrégation des liposomes résultent généralement de la formation de liaisons covalentes ou ioniques entre des liposomes et diverse protéines. Afin d'inhiber l'agrégation des liposomes, les dérivés de PEG ont été incorporés lors de la préparation des liposomes DOPE:DOTAP. Une grande part de recherche est consacrée à élucider les mécanismes d'action des dérivées de PEG à la surface des liposomes, responsables de la réduction de l'opsonisation des liposomes par les protéines plasmatiques et de l'augmentation de la demi-vie de ces liposomes [213].

Une concentration initiale de 25 mol% ou de 50 mol% de DSPE:PEG₂₀₀₀ ou de DSPE:PEG₅₀₀₀ incorporée à la surface des liposomes DOPE:DOTAP, a diminué d'un facteur de 5 l'agrégation des liposomes DOPE:DOTAP incubés dans le DMEM renfermant 10% de sérum de veau (tableau 7). Il a été établi que l'incorporation de polymère hydrophile à la surface des liposomes procure une "barrière stérique" qui inhibe l'association des protéines du sérum à la surface des liposomes [206].

Certains suggèrent que les chaînes hydrophiles de PEG greffées à la surface des liposomes, adoptent une configuration de "brosse" qui réduirait les interactions des protéines plasmatiques du sang avec les liposomes "pegylés" et qui leur permettrait d'échapper à leur capture par le SRE [212]. De plus, la couche hydrophile de PEG à la surface des liposomes permettrait de diminuer les interactions de Van der Waals entre les liposomes et les macromolécules, ceci contribuerait à minimiser leur collision et leur agrégation [213].

Des études affirment qu'en plus de l'hydrophilicité des chaînes de PEG, la flexibilité des chaînes de PEG est un aspect important qui permet de prolonger la demi-vie des liposomes "pegylés". À cause de la flexibilité des chaînes de PEG et des changements structuraux rapides de conformation de PEG, certains proposent que les anticorps ne s'adsorberaient plus aussi facilement sur les liposomes, et que la densité suffisamment élevée du nuage de PEG, empêcheraient les interactions des liposomes avec les opsonines [107,214].

L'entreposage des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP DSPE-PEG₂₀₀₀ et pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ pendant 2 mois à -20°C (avec dextrose), n'a entraîné aucun changement significatif de diamètre (agrégation), de potentiel ζ des liposomes DOPE:DOTAP et d'activité de la β -Galactosidase (figures 30-35). Des études ont démontré que l'ajout des dérivés de PEG à la surface des liposomes est une méthode efficace pour inhiber l'agrégation des liposomes cationiques entreposés à 4°C pendant 4 jours [178]. De plus, l'ajout de saccharides tels que le dextrose ou le tréalose permet

d'introduire des groupements hydrophiles et de neutraliser la charge de surface des liposomes cationiques. Ainsi, l'incorporation du dextrose dans les liposomes cationiques permet de conserver les propriétés physico-chimiques des liposomes et de leur contenu, ainsi que de prévenir leur agrégation et auto-oxydation [94-96].

La diminution importante des diamètres et des potentiels ζ des liposomes DOPE:DOTAP ainsi que la baisse de l'expression de la β -Galactosidase dans les cellules Cos-7 de ces liposomes à 23°C et à 37°C (figures 30-35), pourrait être attribué à une détérioration totale de la membrane liposomique ou à la formation de pores à travers cette membrane [178]. Ceci pourrait entraîner la libération prématurée du plasmide pSV- β -Gal incorporé dans ces liposomes, ainsi que sa dégradation par les nucléases intracellulaires et extracellulaires.

Les effets du PEG sur la transfection de plasmides et sur l'activité des complexes ADN-liposomes cationiques "pegylés" après leur entreposage à -20°C, 4°C, 23°C et à 37°C ne sont pas clairement élucidés [93]. Des études de spectroscopie électronique ont suggéré que le PEG est stable à 37°C, pendant une période de 24 heures dans une solution de 0.1 M de TPS [216]. De plus, puisque l'ajout des dérivés de DSPE-PEG à la surface des liposomes réduit leur mobilité électrophorétique [211], la vectorisation et l'expression du plasmide pSV- β -Gal au sein des cellules Cos-7 médié par ces liposomes, pourrait être compromises.

4.5.2. Déoxycholate de sodium (SDS)

Les liposomes cationiques DOPE:DOTAP sont significativement déstabilisés (réduction de leur diamètre et potentiel ζ) après leur incubation à 23°C en présence de 10 mM de SDS. Ces changements ont été accompagnés par une libération totale de leur contenu liposomal. La présence d'environ 6 mol%, 7 mol% ou 9 mol% de DSPE:PEG₂₀₀₀ ou d'environ 4 mol%, 4.8 mol% ou 5.6 mol% de DSPE:PEG₅₀₀₀ insérés à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP n'a pas résisté complètement à l'action déstabilisante du SDS à 25°C (figures 3, 36 et 37). En effet, une libération d'environ

50% du plasmide pSV- β -Gal incorporé dans les liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ a été observée, comparée à une libération d'environ 30% du plasmide pSV- β -Gal incorporé dans les liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ après 20 minutes d'incubation à 25°C dans le SDS (figures 36 et 37). À cause de la flexibilité et de la rapidité avec laquelle les chaînes de DSPE-PEG₅₀₀₀ changent de conformation [215], ces dernières ont été 2 fois moins insérées à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, par rapport aux chaînes de DSPE-PEG₂₀₀₀ (figure 3). La densité de l'enrobage des chaînes de DSPE-PEG₅₀₀₀ insérées à la surface des liposomes DOPE:DOTAP est probablement un peu moindre, par conséquent, les liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ sont davantage exposés à l'action lytique, ainsi qu'aux effets tensio-actifs du SDS, comparés aux liposomes DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₂₀₀₀.

4.5.3. Lipoprotéines humaines

Les liposomes cationiques DOPE:DOTAP sont fortement déstabilisés en présence des lipoprotéines HDL du plasma sanguin humain, en terme de leur diamètre, de leur potentiel ζ et de la rétention du plasmide pSV- β -Gal incorporé dans ces liposomes (figures 38-43). La diminution marquée du diamètre et du potentiel ζ des liposomes DOPE:DOTAP après leur incubation à 37°C avec les lipoprotéines HDL, pourrait s'expliquer par un échange lipidique entre les lipoprotéines humaines HDL et les liposomes cationiques DOPE:DOTAP. En effet, le transfert des PL des liposomes sur les lipoprotéines HDL entraînerait probablement la formation de pores dans la membrane liposomale, ou la destruction totale de la membrane liposomale, favorisant ainsi la libération du plasmide incorporé [64].

Les résultats obtenus démontrent que l'incorporation de 50 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de DSPE-PEG₅₀₀₀ à la surface des liposomes DOPE:DOTAP protège environ 2 fois plus les liposomes cationiques DOPE:DOTAP des effets déstabilisants des lipoprotéines HDL (figures 38-43). Afin d'expliquer ces résultats, des études d'électrophorèse sur gel de poly(acrylamide) ont traité de l'adsorption de différentes protéines plasmatiques à la surface de nanoparticules incorporant le PEG. La quantité totale d'apolipoprotéines adsorbée à la surface des nanoparticules de PEG, s'est avéré être 4 fois plus faible que

celle obtenue avec les nanoparticules sans PEG (se référer à la section 4.2.2.1). L'adsorption des immunoglobulines de types G et des fibrinogènes à la surface des nanoparticules de PEG a également été significativement réduite [215].

Ces études ont aussi révélé qu'en prolongeant le temps d'incubation des nanoparticules de PEG avec diverses apolipoprotéines, des profils différents d'adsorption sont apparus. Certaines apolipoprotéines ont eu des interactions presque négligeables (non détectables par électrophorèse) avec les nanoparticules de PEG, alors que d'autres se sont adsorbées davantage à la surface des nanoparticules [215]. Serait-il possible qu'après 5 minutes d'incubation des lipoprotéines HDL avec les liposomes DOPE:DOTAP "pegylés" ou non, les diverses apoprotéines s'adsorbent très peu ou pas du tout à la surface de ces liposomes? Ainsi, le temps d'incubation des lipoprotéines humaines avec les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non, influencerait le degré d'adsorption des apoprotéines à la surface des liposomes et par conséquent l'agrégation des liposomes.

Des études supplémentaires devraient être réalisées afin d'élucider l'influence des propriétés de surface des liposomes "pegylés" et du temps d'incubation des liposomes avec les lipoprotéines plasmatiques, sur le degré d'adsorption des apoprotéines des lipoprotéines, à la surface de ces liposomes.

Aucun changement significatif de diamètre (agrégation) et de potentiel ζ des liposomes anioniques DOPE:DMPG, n'a été observé après l'incubation en présence des lipoprotéines humaines HDL, LDL ou VLDL. Le plasmide pSV- β -Gal incorporé dans les liposomes DOPE:DMPG et incubé avec les lipoprotéines HDL, n'a libéré qu'environ 2% de plasmide incorporé (figures 38-41, 43). Ces résultats pourraient s'expliquer probablement par une plus grande répulsion de charges entre les liposomes anioniques et les lipoprotéines du plasma sanguin humain HDL, LDL ou VLDL, minimisant ainsi les échanges lipidiques entre ces liposomes et les lipoprotéines humaines, ainsi que la libération du plasmide liposomal. L'utilisation éventuelle de vecteurs anioniques de transport d'ADN pourrait être contemplée, principalement à cause de leur plus grande

insensibilité à l'égard de différents constituants déstabilisants de l'environnement biologique et de leur moins grande susceptibilité de déclencher des réponses inflammatoires, comparés aux lipides cationiques [217].

5. CONCLUSIONS

L'activité de l'ADN plasmidique au sein des bactéries *E. coli* et des cellules de mammifères Cos-7, a été potentialisée par l'incorporation de l'ADN dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP.

Bien que l'élévation de la température de chauffage des complexes ADN-DOPE:DOTAP ait significativement amélioré l'incorporation du plasmide pSV- β -Gal dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non, l'activité de transfection de la β -Galactosidase dans les cellules de mammifères Cos-7 s'est avérée diminuée probablement à cause de la dénaturation du plasmide. Néanmoins, les activités de transfection du plasmide pSV- β -Gal incorporé dans les liposomes cationiques DOPE:DOTAP "pegylés" ou non, ont grandement été améliorées comparées aux activités de transfection obtenues lors de la précipitation du plasmide pSV- β -Gal au phosphate de calcium.

La présence d'une couche protectrice hydrophilique de densité suffisamment élevée de DSPE-PEG à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, a permis d'augmenter le rayon de solvation des liposomes cationiques, de neutraliser la charge de surface des liposomes cationiques (potentiel ζ), tout en permettant aux liposomes cationiques DOPE:DOTAP d'interagir avec l'ADN génomique ou l'ADN plasmidique.

La présence de DSPE-PEG₂₀₀₀ ou de DSPE-PEG₅₀₀₀ à la surface des liposomes cationiques DOPE:DOTAP, diminue considérablement l'agrégation des liposomes cationiques en présence de certains constituants biologiques (comme le sérum de veau, le déoxycholate de sodium, et les lipoprotéines du plasma sanguin humain).

Bien que la présence des dérivés de DSPE-PEG confère une plus grande protection aux liposomes cationiques DOPE:DOTAP vis-à-vis de leur déstabilisation par les constituants biologiques déjà mentionnés, la présence du PEG à la surface de ces liposomes constitue une "barrière stérique" qui limite la quantité d'ADN pouvant être incorporée dans les liposomes cationiques. Les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP

“pegylés” ont toujours généré des activités d’expression de la β -Galactosidase, nettement inférieures à celles obtenues avec les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP. En effet, on ne doit pas perdre de vue que sous l’angle thérapeutique, la recherche d’une stabilité optimale, n’est pas systématiquement compatible avec l’efficacité recherchée; en effet, cette stabilité peut, non seulement modifier l’épuration plasmatique des liposomes, mais également leur captation par les cellules cibles. L’insertion des dérivés du DSPE-PEG micellaires suite à la formation des complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP n’a pas entraîné de changement significatif du diamètre de ces complexes par rapport aux mesures obtenues avec les complexes pSV- β -Gal-DOPE:DOTAP auxquels ont été incorporés les dérivés du DSPE:PEG. Cependant, l’insertion des micelles de PEG a permis d’améliorer l’incorporation du plasmide dans les liposomes DOPE:DOTAP “pegylés” et l’activité de la β -Galactosidase, comparée à celles obtenues avec les liposomes DOPE:DOTAP auxquels ont été incorporés les dérivés du DSPE-PEG.

Des études supplémentaires pourraient être réalisées en vue d’élucider davantage le(s) effet(s) du PEG sur l’interaction des complexes ADN-liposomes cationiques avec les membranes cellulaires, ainsi que sur la livraison et l’expression de l’ADN dans le noyau. De plus, la possibilité de fixer des anticorps à l’extrémité de la chaîne de PEG pourrait être contemplée.

Objectifs futurs

D’un point de vue plus réaliste, certains désavantages dans l’utilisation des liposomes cationiques peuvent constituer des limitations importantes pour des applications thérapeutiques futures. En effet, la nécessité de se procurer des lipides cationiques synthétiques, à des coûts parfois élevés, leur instabilité structurale, leur incompatibilité avec l’environnement biologique, riche en macromolécules chargées négativement, le déclin de leur activité de transfection avec le temps, ainsi que leur risque potentiel de cytotoxicité [202], représentent des obstacles indéniables à l’évolution de la thérapie génique avec les liposomes cationiques.

L'efficacité de transfection *in vitro* des vecteurs cationiques a été attribuée à une plus grande prise en charge de l'ADN par les cellules, due à une interaction électrostatique favorable entre les charges négatives des cellules et les charges positives des porteurs liposomaux [201]. Cependant, la capture des liposomes par les cellules *in vivo* (par exemple, les cellules du SRE, les cellules parenchymales hépatiques et d'autres cellules pour lesquelles les liposomes ont de l'affinité) est considérable et largement indépendante de la charge de surface des liposomes [198]. Des études ont démontré que les liposomes neutres ou chargés positivement obtiennent une charge nette négative en présence du sang, à cause de la liaison des protéines plasmatiques à leur surface. Ainsi, une charge de surface positive peut ne pas être un prérequis pour la transfection *in vivo* efficace médiée par les liposomes. Ceci est supporté par des expériences réalisées avec une variété de plasmides incorporés dans des liposomes neutres ou chargés négativement qui ont assuré l'expression efficace de plasmides chez les rongeurs [198-200].

Bien qu'un grande variété de lipides cationiques présentent des différences importantes d'efficacité de livraison de gènes dans différents types cellulaires, aucun patron clair concernant les paramètres physico-chimiques des complexes ADN-lipides cationiques, nécessaires pour assurer le transport et la livraison optimale de gènes dans les cellules, n'a été établi [206]. Le très grand degré de variabilité de l'efficacité de transfection des complexes ADN-lipides cationiques dans différents types cellulaires, limite grandement l'évolution de la thérapie génique.

De plus, de nombreux efforts devraient être consacrés à l'évaluation des effets de l'environnement biologique sur le destin et la fonction de l'ADN et des porteurs liposomaux dans le corps et dans les cellules. Il conviendrait également d'élucider le potentiel immunogénique des liposomes cationiques contenant les acides nucléiques et s'il existe ou non, une réponse anti-PL. De telles réponses pourraient induire une résistance au traitement ou signaler le déclenchement d'une réponse auto-immunitaire. Des résultats tendent à démontrer que l'ADN n'est pas significativement

immunogénique *in vivo* lorsqu'il est complexé aux liposomes cationiques ou lorsque l'ADN est présent sous d'autres formes [212].

Des études supplémentaires devront être réalisées afin de trouver des moyens pour optimiser les rendements d'incorporation de l'ADN dans les liposomes anioniques, et d'assurer par le biais de ces vecteurs, le ciblage spécifique et l'expression efficaces de l'ADN au sein des tissus ou cellules visés, en vue d'une thérapie génique.

Finalement, l'utilisation courante de la thérapie génique pour traiter ou prévenir différentes maladies héréditaires ou acquises, exigera le développement de formulations de vecteurs non-viraux de transport de gènes:

- À faible coût, faciles à préparer et à conserver, sans perte d'activité.
- À potentiel thérapeutique similaire aux produits pharmaceutiques conventionnels, en terme de leur nature, de leur composition, caractérisation, mode d'administration, efficacité et sécurité.
- Compatibles avec les caractéristique physiologiques et physico-chimiques des tissus ou cellules ciblés.
- Capables d'accommoder la taille et la charge de l'ADN.
- Capables d'assurer la livraison spécifique et l'expression efficace de l'ADN dans le noyau [120].

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de recherche, le Docteur Nigel C. Phillips pour avoir cru en moi dès le début, pour ses connaissances, ses conseils judicieux, sa disponibilité, son soutien moral et son dévouement lors du projet.

Je tiens à remercier grandement Mme Marie Roumi, étudiante au doctorat et une amie sincère, pour ses encouragements, et son soutien moral. J'aimerais exprimé ma reconnaissance au Docteur Jean-Christophe Leroux et au Docteur Patrice Hildgen pour les précieux conseils donnés lors des séances d'évaluation des rapports trimestriels.

Je voudrais également témoigner ma gratitude aux personnes qui m'ont encouragé à persévérer, qui ont veillé sur moi et qui ont démontré une patience exemplaire à mon égard dans les moments difficiles, en particulier ma famille et ma très chère amie Faten Fares.

Finalement, je ne saurai couronner la fin de ce mémoire sans souligner l'appui moral soutenu d'une personne chère à mon coeur, Walid Khacho qui m'accompagne dans la vie de tous les jours.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ostro, M.J., Liposomes: From Biophysicists to Therapeutics **1987** (New York: Marcel Dekker).
2. Bangham A.D. *Nature*. **1961**, 192, 1197.
3. Bangham, A.D., Hill, M.W, Miller, N.G.A. Methods in Membrane Biology, Plenum Press, New York, N.Y. **1974**.
4. Weissmann, G., Rita, G.A. *Natl. New. Biology*. **1972**, 240, 167.
5. Chappel, J.B., Crofts A.D. *Biochim. Biophys. Acta*. **1966**, 7, 293.
6. Papahadjopoulos, D., G. Poste., B.E. Shaeffer. *Biochim. Biophys. Acta*. **1973**, 323, 23.
7. Papahadjopoulos, D., G. Poste., B. E. Shaeffer., W.J. Vail. *Biochim. Biophys. Acta*. **1974**, 352, 10.
8. Lasic, D.D. *Recherche*. **1989**, 20, 904-913.
9. Chapman, D., Wallch, D.F.H. Chapman, D. Biological membranes, Academic Press. **1968**, pp. 125-199.
10. Braidman, I.P., Gregoriadis G. *J. Biochem*. **1977**, 164, 439-445.
11. Bothorel, P., Belle J., Lemaire B. *Chem. Phys. Lipids*. **1974**, 12, 96-116.
12. Cullis, P.R., Kruijff B. *Biochim. Biophys. Acta*. **1979**, 559, 399-420.
13. Bernard, E., Faucon, J.F., Dufourcq, J. *Biochim. Biophys. Acta*. **1982**, 688, 152-162.
14. Bloj, B., Zilversmit, D.B. *Biochemistry*. **1976**, 15, 1277-1283.
15. Boggs, J.M. *Can J. Biochemistry*. **1980**, 58, 755-780.
16. Chen, S.C., Sturtevant, J.M. *Biochemistry*. **1980**, 20, 713-718.
17. Ryman, B.E., Tyrrel, D.A. Essays in Biochemistry. Academic Press. Londres. **1980**. 16, 49-98
18. Egerdie, B., Singer, M. *Chem. Phys. Lipids*. **1982**, 31, 75-85.
19. Chapman, D. Biological membranes, Academic Press. Londres. **1982**, 179-224.
20. Papahadjopoulos, D. *Ann. NY Acad. Sci*. **1978**, 308, 1-412.
21. Jaminet, F. *J. Pharm. Belg*. **1980**, 35, 200-222.
22. Gregoriadis, G. *Drug Carriers in biology and medicine*, London, Academic Press. **1979**, 102-187
23. Gregoriadis, G. Liposomes in biological systems, New York, J. Wiley. **1980**, 102-149.
24. Puissieux, F., Poly P.A., Drouin-Salin, D. *Labo Pharma, Probl. Tech*. **1982**, 30, 133-151.
25. Couvreur, P., Kante, B., Roland, M. *Pharm Acta Helv*. **1978**, 53, 341-347.
26. Roland, M., Couvreur P. *Bull. Acad. Méd. Bel*. **1981**, 136, 107-124.
27. Gregoriadis, D. *New Engl. J. Med*. **1976**, 295, 704-710.
28. Gregoriadis, D. *New Engl. J. Med*. **1976**, 295, 765-770.
29. Gregoriadis, G., Leathwood P.D., Ryman B.E. *FEBS Lett*. **1971**, 14, 1495-1499.
30. Gregoriadis, G. *New Engl. J. Med*. **1976**, 295, 704-710, 765-770.
31. Finkelstein, G. Weissman. *J. Lipids. Res*. **1978**, 19, 289-303.
32. Poste, G., Papahadjopoulos D. *Nature*. **1976**, 261, 699-701.

33. Weinstein, J.N., Blumenthal, R., Sharrow, S.O., Henkart, P.A. *Biochim. Biophys. Acta.* **1978**, 509, 272-283.
34. Allison, A.C., Gregoriadis, G. *Nature.* **1974**, 252, 252.
35. Torchillin, V.P. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 1985, 2, 65-115.
36. Gregoriadis, G., ed. *Liposomes as Carriers of Drugs: Recent Trends and Progress*, Wiley. **1988**.
37. Puissieux, F., Couvreur, P., Delatre, J., Devissagnet, J-P. *Liposomes: New Systems and New Trends in their Applications*, Éditions de Santé, **1995**.
38. Luzzati, V., Mustachi, H., Skoulios A., Husson, R. *Acta Crystallogr.* **1960**, 13, 660-667.
39. Brown, G.H., Doane, J.W, Noff, V.D. *Structure and properties of liquid Crystals*, **1970**. CRC, Boca Raton, FL, USA.
40. Ringsdorf, H., Schlarb, B., Venzmer J. *Angew. Chem.* **1988**, 100, 117-162.
41. Juliano, R.L., Stamp, D. *Biochem. Pharmacol.* **1978**, 27, 21-27.
42. Sessa, G., Weinsmann, G. *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 3295-3301.
43. Gregoriadis, G. *Liposomes as Drug Carriers: Recent Trends and Progress*. Wiley, Chichester. Ed. **1988**.
44. Mayhew, R., Papahadjopoulos, D. *Liposomes* (Ostro, M.J. ed.), **1983**, pp. 289-341.
45. Lopez-Berestein, G., Filder, I.J. *Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer*. Alan Liss, New York. **1989**.
46. Leserman, L.D., Machy P., Barbet J. *Nature.* **1981**, 293, 226-228.
47. Allen, T.M., Ryan J.L., Papahadjopoulos D. *Biochim. Biophys. Acta.* **1985**, 818, 205-210.
48. Illum, L., Davis, S.S. *J. Pharm. Sci.* **1983**, 72, 1086-1089.
49. Allen, T. M., Hansen, C. *Biochim. Biophys. Acta.* **1991**, 1068, 133-141
50. Woodle, M. C, Newman, M. S., Martin, F. J., *Int. J. Pharm.* **1992**, 88, 327-334.
51. Pratten, M.K., Lloyd, J.B., Horpel, G., Ringsdorf, H., *Makromol. Chem.* **1985**, 186, 725-733.
52. Lasic, D.D. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1685-1698.
53. Willemot, J.M. Thèse Diplôme Etat, Docteur en pharmacie, Paris XI, 1983.
54. Nir, S., Bentz, J., Wilschut, J., Duzgunes, N. *Prog. Surf. Sci.* **1983**, 13, 1-124.
55. Rowland, M.M., Woodley, J.F. *Biochim. Biophys. Acta.* **1980**, 620, 400-409.
56. Scherphof, G., Damen, J., Hoesktra, D. *Liposomes: form structure to therapeutic*, **1981**, pp. 299-322
57. Wassef, N.M., Matyas, G.R., Alving, C.R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 176, 866-874.
58. Scherphof, G., Roerdink, F., Waite, M., Parks, J. *Biochem. Biophys. Acta.* **1978**, 542, 296-307.
59. Tall, A.R., Tabas, I., Williams, J.K. *Methods Enzymol.* **1986**, 128, 647-657.
60. Lee, K.D., Hong, K., Papahadjopoulos, D. *Biochem. Biophys. Acta.* **1991**. In press.
61. Arakawa, E., Imay, Y., Kobayashi, H., Okomura, K., Sezaki, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, 23, 2218-2222.
62. Zborowski, J., Roberlink, F., Sherpherf, G. *Biochem. Biophys. Acta*, **1977**, 497, 183-191.
63. Kamien, R.D., Nelson, D.R. *Phys Rev.* **1996**, 53, 650-658.
64. Rowland, M.M., Woodley, J.F. *FEBS Letters.* **1981**, 41-44.

65. Poste, G., Bucana, C., Raz, A., Bugelski, P., Kirsh, R., Filder, I.L. *Cancer Res.* **1982**, 42, 1412-1422.
66. Gregoriadis, G. Drug entrapment in liposomes. *FEBS Letters.* **1973**, 36, 292-296.
67. Kimelberg, H.K., Tracy, T.F., Biddlecome, S.M., Bourke, R.S. *Cancer Res.* **1976**, 36, 2949-2957.
68. Freise, J., Mueller, W.H., Brotsch, C., Schmidt, F.W. *Biomedicine.* **1982**, 258, 180-192.
69. Lasic, F.J., Martin, A., Gabizon, S.K., Huang, D. Papahadjopoulos. *Biochem. Biophys. Acta.* **1991**, 1070, 187-192.
70. Roerdink, F., Dukstar J., Hartman, G., Bolscher, B., Scherphof, G. *Biochem. Biophys. Acta.* **1981**, 667, 79-89.
71. Szoka, F., Papahadjopoulos, D. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **1980**, 9, 467-508.
72. Olson, F., Hunat, C.A., Szoja, F.C., Vail, W.J., Papahadjopoulos, D. *Biochim. Biophys. Acta.* **1973**, 557, 9-23.
73. Huang, C.H. *Biochemistry.* **1969**, 8, 344-352.
74. Pain, D., Das, P.K., Ghosh, P.C., Bachhawat, B.K. *J. Biosci.* **1984**, 6, 811-816.
75. Allen, T.M. *J. Liposome Res.* **1992**, 2, 289-305.
76. Holland, J.W., Cullis, P.R., Madden, T.D. *Biochemistry.* **1996**, 35, 2610-2617.
77. Papahadjopoulos, D., Allen, T.M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K, Huang, S.K., Lee, K.D., Woodle, M.C., Lasic, D.D., Redemann, C. and Martin, F.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 11460-11464.
78. Allen, T.M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1994**, 13, 285-309.
79. Woodle, M.C., Lasic, D.D. *Biochim. Biophys. Acta.* **1992**, 1113, 171-199.
80. Papahadjopoulos, D., Gabizon, A. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1990**, 343, 85-93.
81. Needham, D., McIntoch, T.J., Lasic, D.D. *Biochim. Biophys. Acta.* **1992**, 1108, 40-48.
82. Yoshioka, H. *Biomaterials.* **1991**, 12, 861-864.
83. Phillips, N.C., Heydari, C. *Pharmaceutical Sciences*, **1996**, 2, 73-76.
84. Wang, S., Lee, R.J., Cauchon, G., Gorenstein, D.G., Low, P.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995**, 92, 3318-3322.
85. Janoff, A.S. *Lab. Invest.* **1992**, 66, 655-658.
86. Gref, R., Domb, A., Quelled, P., Blunk, T., Müller, R.H., Verbavatz, J.M., Langer, R. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, 16, 215-233.
87. Forssen, E.A., Todes, Z.A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, 78, 1973-1877.
88. Rahman, A., More, N., Schein, P.S. *Cancer Res.* **1982**, 42, 1817-1825.
89. Litterst, C.L., Sieber, S.M., Copley, M., Parker, R.J. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1982**, 64, 571-528.
90. Juliano, R.L., Stamp, D. *Biochem. Pharmacol.* **1978**, 27, 21-27.
91. Juliano, R.L., Stamp, D., McDullough, N. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1978**, 308, 411-432.
92. Gregoriadis, G. *TIBTECH.* **1995**, 13, 525-537.
93. Asao, T., Shibata, H.R., Batist, G., Brodt, P. *Cancer Res.* **1992**, 52, 6254-6257.
94. Janoff, A.S. *Lab Invest.* **1992**, 66, 655-658.
95. Gabizon, A et al. *Cancer Res.* **1994**, 54, 987-992.
96. Gill, P.S. et al. *J. Clin. Oncol.* **1995**, 13, 996-1003.

97. Puissieux, F., Delattre, J. Les liposomes applications thérapeutique. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, **1985**, p. 232.
98. Shaw, I.H., Knight, C.G., Dingle J.T. *J. Biochem.* **1976**, 158, 473-476.
99. Shaw, I.H., Knight, C.G., Page Thomas, D.P., Phillips, N.C. *Br. J. Exp. Path.* **1979**, 60, 142-150.
100. Geng, Y., Blanco, F.J., Cornelisson, M., Lotz M M. *J. Immunol.* **1995**, 155, 796-801.
101. Szepanski, A., Moater, T., Carley, W.W., Gerristen, M.E. *Arthritis & Rheum.* **1994**, 37, 495-503.
102. Bergström, S., Danielsson, H., Samuelsson, B. *Biochim. Biophys. Acta.* **1964**, 90, 207-212.
103. Hemler, M., Lands, W.E.M., Smith, W.L. *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 5575-5581.
104. Maier, J.A., Hla, T., Maciag, T. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 10805-10808.
105. O' Banion, M.K., Winn, V.D., Young, D.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1992**, 89, 4888-4892.
106. Hung, G.L., Galea-Lauri, J., Mueller, G.M., et al. *Gene Ther.* **1994**, 1, 64-69.
107. Bandara, G., Mueller, G.M., Galea-Lauri, J., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1993**, 90, 10764-10768.
108. Nita, S., Ghivizzani, C. *Arthritis Rheum.* **1996**, 39, 820-828.
109. Glück, R. *Vaccine. Design: The subunit and Adjuvant Approach* (Powell, M.F. and Newman M.J., eds), Plenum Press, **1995**, pp. 325-345.
110. Alving, C.R. *J. Immunol. Methods.* **1991**, 140, 1-13.
111. Childers, N.K., Denis, F.R., McGee, N.F., Michalek, S.M. *Reg. Immunol.* **1990**, 3, 8-16.
112. Basham, T., Rios, C.D., Holdener, T., Merigan, T.C. *J. infect. Dis.* **1990**, 161, 1006-1009.
113. Fischl, M.A., Richman, D.D., Grieco, M.H., Gottlieb, M.S., Volberding, P.A., Laskin, O.L., Leedom, J.M., Groopman, J.E., Mildvan, D., Schooley, R.T., Jackson, G.G., Durack, D.T., King, D., Dickinson G.M., Patrone-Reese, J., Fletcher, M.A., Kennedy, C.J., McCutchan, J.A., Spector, S.A., Lange M., England, A., McKinley, G.F., Wolfe, P.R., Chafey, S., Lederman, J., et al. *New Eng. J. Med.* **1987**, 317, 185-291.
114. Crystal, R.G. *Nature Med.* **1995**, 1, 15-17.
115. Mulligan, R.C. *Science.* **1993**, 260, 926-932.
116. Khan, A. *Bulletin de l'ordre des pharmaciens.* 1996, 353, 399-408.
117. Horwithz, A.L. *Curr Top Microbiol Immunol.* **1991**, 168, 185-200.
118. Evans, C., Robbins, P.D. *J. Rheum.* 1994, 21, 779-782.
119. Rolland, A. *Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications.* (Marcel Dekker, Inc. New York). **1993**.
120. Ledley, F.D. *Hum. Gene. Ther.* **1995**, 6, 1129-1144.
121. Ledley, F.D. *Exp. Op. Invest. Drugs.* **1994**, 3, 913-921.
122. Ledley, F.D. *Curr Opinion Biotechnol.* **1994**, 5, 626-636.
123. Miller, A.D. *Hum. Gene. Ther.* **1990**, 1, 5.
124. Miller, A.D. *Nature.* **1992**, 357, 455-460.
125. Crystal, R.C., McElvaney, N.G., Rosenfeld, M.A., Chu, C.S., Mastrangeli, A., Hay, J.G., Brody, S.L., Jaffe, H.A., Eissa, N.T., Danel, C. *Nat Genet.* **1994**, 8, 42-51.
126. Lemarchand, P., Jaffe, J.A., Danel, C., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1992**, 89, 6482-6486.

127. Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., Fleger, P.L. *Science*. **1990**, 247, 1465-1468.
128. Lee, R., Huang, L. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 14, 8481-8487.
129. Hodgson, C.H. *Biotechnology*. **1995**, 13, 222-225.
130. Hofland, H., Shephard, L., Sullivan S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93, 7305-7417.
131. Zabner, J., Fasbender, A.J., Moninger, T., Poellinger, K.A. Welsh, M.J. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 18997-19007
132. Holmen, S.L., Vanbrocklin, M.W., Eversole, R.R., Stapleton, S.R., Ginsberg, L.C. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **1995**, 31, 347-351.
133. Farhood, H., Serbina, N., Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, 1235, 289-295.
134. Graham, F.L., Abrahams, P.J., Mulder, C., Heynecher, H.L., Warnaar, S.O., Devries, F.A.J., Fiers, W., Van der eb A.J. Cold Spring Harb. *Symp. Quant. Biol.* **1974**, 39, 637-640.
135. Loyter, A., Scangos, G.A., Ruddle, F.H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1982**, 79, 422-426.
136. Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R. *Cell*, **1978**, 14, 725-731.
137. Capecchi, M.R. *Cell*. **1980**, 22, 479-488.
138. Thompson, T.A., Gould, M.N., Burkholder, J.K., Yang, .N.S. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **1993**, 29A, 165-170.
139. Burkholder, J.K., Decker, J., Yang, N.S. *J. Immunol. Methods*, **1993**, 165, 149-156.
140. Chu, G., Hayakawa, H., Berg, P. *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 13111-1326.
141. Behr, J.P. *Biconj Chem.* **1994**, 5, 382-389.
142. Legendre, J.Y., Szoka, F.C. *Pharmaceut Res.* **1992**, 9, 1235-1242.
143. Yoshimura, et al. *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 3233-3240.
144. Felger, J.H., Kumar, R., Sridhar, C.N., Wheeler, C.J., Tasi, Y.J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., Felger P.L. *J Biol Chem.* **1994**, 269.2550-2561.
145. Malone, R.W., Felger, P.L., Verma, I.M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, 86, 6077-6081.
146. Gao, X., Huang, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**. 179, 280-285.
147. Spörlein, B., Koop, H.-U. *Ther. Appl. Genet.* **1991**, 83, 1-5.
148. Felger, J.H., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, HW., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, 84, 7413-7417.
149. Felger, P.M., Ringold, G.M. *Nature*. **1989**, 337, 387-388.
150. Behr, J.P. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5861-5864.
151. Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S.B., Minsk A. *Biochemistry.* **1993**, 32, 7143-7151.
152. Barenholz, Y., Amselem, S.M Lichtenberg, D. *FEBS Lettters.* **1979**, 99, 210-214.
153. Szoka, F., Ppahadjopoulos, D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1978**, 75, 4194-4198.
154. Kirby, C., Gregoriadis, G. *Biotechnology*, **1984**, 184, 979-989.
155. Remy, J.S., Sirlin, C., Vierling, P., Behr, J.P. *Bioconjugate Chem.* **1994**, 5, 647-654.
156. Felgner, J.H., Kumar, R., Sridhar, C.N., Wheeler, C.J., Tsai, Y.J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., Felgner, P.L. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 2550-2561.
157. Zhou, X., Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1189, 195-203.

158. McLachlan, G., Davidson, H., Davison, D., Dickinson, P., Dorin, J., Porteous, D. *Biochemica*. **1994**, 11, 19-21.
159. Zhou, X.H., Klibanov, A.L., Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* 1991, 1065, 8-14.
160. Farhood, H., Bottega, R., Epand, R.M., Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1111, 239-246.
161. Canonico, A.E., Plitman, J.D., Conary, J.T., Meyrick, B.O., Brigham, K.L. *J. Appl. Physiol.* **1994**, 77, 415-419.
162. Canonico, A.E., Conary, J.T., Meyrick, B.O., Brigham, K.L. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1994**, 10, 24-29.
163. Alton, E.X., Middleton, P.G., Caplan, N.J., Smith, S.N., Steel, D.M., Munkonge, F.M., Jeffery, P.K., Geddes, D.M., Hart, S.L., Williamson, R., et al. *Nat. Genet.* **1993**, 5, 135-142.
164. Hyde, S.C., Gill, D.R., Higgins, C.F., Trezise, A.E., Macvinish, L.J., Cuthbert, A.W., Ratcliff, R., Evans, M.J., Colledge, W.H. *Nature*. **1993**, 362, 250-255.
165. Zhu, N., Liggitt, D., Liu, Y., Debs, R. *Science*. **1993**, 261, 209-211.
166. Conry, R.M., Lobuglio, A.F., Kantor, J., Schlom, J., Loechel, F., Moore S.E., Sumerel, L.A., Barlow, D.L., Abrams, S., Curiel, D.T. *Cancer Res.* **1994**, 54, 1164-1168.
167. Phillip, R., Brunette, E., Kilinski, L., Murugesh, D., McNally, M.A., Ucar, K., Rosenblatt, J., Okarma T.B., Lebkowski, J.S. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, 14, 2411-2418.
168. Nabel, E.G., Plautz, G., Nabel, G.J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, 89, 5157-5161.
169. Walter, R., Leibiger, I., Kiessling, U., Sarrach, D., Zuhlke, H. *Biomed. Biochim. Acta.* **1988**, 47, 343-348.
170. Legendre, J.Y., Szoka, F.C. Jr. *Pharm. Res.* **1992**, 9, 1235-1242.
171. Felgner, J.H., Kumar, R., Sridhar, C.N., Wheeler, C.J., Tsai, Y.J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., Felgner, P.L. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 2550-2561.
172. Malone, R.W., Felgner, P.L., Verma, I.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, 86, 6077-6081.
173. Walker, C., Selby, M., Erickson, A., Cataldo, D., Valensi, J.P., Van-Nest, G.V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, 89, 7915-7918.
174. Debs, R.J. *Liposomes as Tools in Basic Research and Industry*. CRC Press, Inc, **1995**.
175. Fraley, R., Straubinger, R., Rule, G., Springer, L., Papahadjopoulos, D. *Biochemistry*. **1981**, 20, 6978.
176. Felgner, P.L., *Adv. Drug Delivery Rev.* **1990**, 5, 163-187.
177. Solodin, I., Brown, C.S., Bruno, M.S., Chow, C.Y., Jang, E.P., Debs, R.J., Heath, T.D. *Biochemistry*. **1995**, 34, 13537-13544.
178. Hong, K., Zheng, W., Baker, A., Papahadjopoulos, D. *FEBS Letters* **400**. **1997**.
179. Liu, Y., Liggitt, D., Zhong, W., Guanhuang, T.U., Gaensler, K., Debs, R. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 41-42.
180. Sakaguchi, M., Nakamura, H., Sonoda, K., Hamada, F., Hirai, K. *Vaccine*. **1996**, 14(8), 747-752.
181. Farhood, H., Bottega, R., Epand, R.M., Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1111, 239-246.
182. Kamien, R.D., Nelson, D.R. *Phys Rev.* **1996**, E 53, 650-658.
183. Radler, J., Koltover, I., Salditt, T., Safinya, C. *Science*. **1997**, 275, 810-814.
184. Bailey, A., Cullis, P. *Biochemistry*. **1997**, 37, 1628-1634.
185. Wang, C.Y., Huang, L. *Biochemistry*. **1989**, 28, 9508-9514.

186. Connor, J., Huang, L. Cell Fusion (Sowers A. E., Ed.) Plenum Press, New York, **1987**, chapter 13, pp. 285-299.
187. Felgner, P.L. and Holm, M. *Focus* **11**. **1989**, 21-25.
188. Felgner, J.H., Kumar, R., Sridhar, C.N., Wheeler, C.J., Tsai, Y.J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., Felgner, P.L. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 2550-2561.
189. Zhou, X., Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1189, 195-203.
190. Blumenthal, R., Seth, P., Willingham, M.C., Pastan, I. *Biochemistry*. **1986**, 25, 2231-2237.
191. Seth, P. *J. Virol.* **1994**, 68, 1204-1206.
192. Curiel, D.T., Agarwal, S., Wagner, E., Cotton, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 8850-8854.
193. Wheeler, C.J., Sukhu, L., Yang, G., Tsai, Y., Bustamente, C., Felgner, P., Norman, J., Manthorpe, M. *Biochim. Biophys. Acta*. **1995**, 1280, 1-11.
194. Hans, S., Sawyer, S.M. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **1996**, 19, 73-87.
195. Parker, S.E., Vahlshing, L.H., Serfilippi, L.M., Franklin, C.J., Doh, S.G., Gromkowski, S.H., Lew, D., Manthorpe, M., Norman, J. *Hum. Gen. Ther.* **1995**, 6, 575.
196. Jay, D.G., Gilbert, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 89, 2525-2529.
197. Loeffler, J.P., Behr, J.P. *Methods in Enzymology: Recombinant DNA* (Wu R., Ed., Academic Press New York, **1993**, 599-618.
198. Staedel, C., Hua Z., Broker, T.R., Chow, L.T., Remy, J.S., Behr, J.P. *J. Invest. Dermatol.* **1994**, 5, 768-772.
199. Lee, K.D., Hong, K., Papahadjopoulos, D. *Biochem. Biophys. Acta*. **1991**. In press.
200. Sakaguchi, M., Nakamura, H., Sonoda, K., Hamada, F., Hirai, K. *Vaccine*. **1996**, 14(8), 747-752.
201. Wennerstrom, H., Lindman, B. *J. Phys. Chem.* **1979**, 23, 2931-2941.
202. Brent, R., Kingston, R., More., D., Sieman, J.G., Smith, J., Struhl, K. In *Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols*, John Wiley. Inc.
203. Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
204. Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S., Minsky, A. *Biochemistry*. **1993**, 32, 7143-7151.
205. Gaber, M., Hong, K., Huang, S., Papahadjopoulos, D. *Pharmaceutical Res.* **1995**, 12, 1407-1416.
206. Senior, J., Delgano, C., Fisher, D., Tilcock, C., Gregoriadis, G. *Biochim. Biophys. Acta*. **1991**, 1062, 77-82.
207. Juliano, R.L. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1988**, 2, 31-54.
208. De Gennes, P.G. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1987**, 27, 189-209.
209. Friend, D., Papahadjopoulos, D., Debs, R. *Biochim. Biophys. Acta*. **1996**, 1278, 41-50.
210. Ito, A., Miyazoe, R., Mitoma, J., Akao, T., Osaki, T. *Biochem. Int.* **1990**, 22, 235-241.
211. Woodle, M.C., Collins, L.R., Sponsler, E., Kossovsky, «N., Papahadjopoulos, D., Martin, F.J. *Biophys. J.*, in press.
212. Eagle, H. *Science*. **1959**, 130, 432 et Hutchings, S.E., Sato, G.H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1978**, 75, 901.
213. Tan, J., Butterfield, D., Voycheck, C., Caldwell, K., Li, J. *Biomaterials*. **1993**, 14, 823-833.
214. Joen, S.I., Lee, J.H., de Gennes, P.G. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, 142, 149-158.

215. Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Muller, R.H., Verbavatz, J.M., Langer, R. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1995**, 116, 215-233.
216. Gref, R., Minamitake, Y., Peraccia, M.T., Trubetskoy, V., Milshcheyn, A., Sinkule, J., Torchilin, V., Langer, R. *Proc. Int. Symp. Controll. Release. Bioact. Mater.. Controll. Release Soc.* **1993**, 20, 131-132.
217. Dingle, J.T., Gordon, J.L., Hazleman, B.L., Knight, C.G., Page Thomas, D.P., Phillips, N.C., Shawn, I.H., Fildes, F.J.T., Oliver, J.E., Turner, E.H., Lowe, J.S. *Nature.* **1978**, 271, 372-373.
218. Lindgren, et al. In G.J. Nelson (eds) *Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitation, Composition and Metabolism* (Wiley-Interscience, New York), **1972**, pp.181-274.

ANNEXE

Cationic liposome stability in synovial fluid

Sophie Khalifé (M.Sc.) and Nigel C. Phillips (Ph.D.)

Faculty of pharmacy, University of Montreal, CP 6128,

Succursale Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7


ph (514) 343-5851; fax (514) 343-2102

Article submitted in the form of a **brief report**

to the Arthritis and rheumatism journal

April 1998

Cationic liposomes aggregate and release incorporated plasmid DNA in the presence of human synovial fluid, hyaluronic acid and chondroitin sulfate A. Anionic liposomes would therefore appear to offer a number of advantages over cationic liposomes for intra-articular gene therapy with plasmid DNA vectors.

ABSTRACT

Objectives. To determine the effects of human synovial fluid (HSF), hyaluronic acid (HA) and chondroitin sulfate A (CS) on the stability of cationic DOPE:DOTAP liposomes, DOPE:DOTAP liposomes containing 10 mol % DSPE-PEG₅₀₀₀, or anionic DPPC:DMPG liposomes, and assess their ability to retain plasmid DNA.

Methods. Cationic or anionic liposomes containing plasmid pBR322 were incubated with 50% v/v HSF, HA (2.2 mg/ml final concentration), or CS (0.042 mg/ml final concentration) at 37°C for 10, 20 or 30 min. The apparent liposome diameter (aggregation) and zeta (ζ) potential were determined for the different liposome preparations at each time interval. Determination of plasmid DNA release after incubation of the liposomes in HSF, HA or CS was carried-out by fluorescent analysis using ethidium bromide.

Results. Significant aggregation and reduction in liposomal ζ potential of cationic DOPE:DOTAP liposomes was observed following incubation in HSF, HA or CS. These changes were associated with the release of 90-100% of incorporated plasmid DNA. Although the presence of DSPE-PEG₅₀₀₀ on the surface of cationic DOPE:DOTAP liposomes significantly inhibited aggregation in the presence of HSF, HA or CS, it did not considerably inhibit the release of incorporated plasmid DNA. In contrast, no significant aggregation, change in ζ potential or release of incorporated plasmid DNA was observed after incubation of anionic DPPC:DMPG liposomes in HSF, HA or CS.

Conclusions. Cationic liposomes aggregate and release incorporated plasmid DNA in the presence of HSF. Although the presence of DSPE-PEG₅₀₀₀ protects cationic liposomes against aggregation, it does not inhibit the ability of linear anions such as HA

or CS to induce plasmid DNA release. Anionic liposomes would therefore appear to offer a number of advantages over cationic liposomes for intra-articular gene therapy with plasmid DNA vectors.

INTRODUCTION

Gene therapy offers a novel approach to the treatment of arthritis (1). Liposomes formulated from cationic lipids are currently being evaluated for gene therapy in a variety of diseases (2-5). Cationic liposomes bound to plasmid DNA readily form large, heterogeneous aggregates when prepared at high concentrations (4,6) or in the presence of tissue culture media (unpublished observation). We believe that the lack of understanding the physicochemical characteristics of the cationic liposomes/DNA complexes has hampered the pharmaceutical development of these complexes.

Although cationic liposomes have been used to deliver the human interleukin-1 receptor antagonist gene (IL-1 Ra) as an anti-inflammatory treatment (7) there appear to be problems of low levels of gene expression and induction of inflammation following intra-articular injection (8) Such responses may be related to the use of cationic liposomes, since the intra-articular administration of anionic liposomes does not appear to be pro-inflammatory (9). Hyaluronic acid (HA) forms inflammation-inducing aggregates with polycations (10) and this may explain the pro-inflammatory activity of cationic liposomes injected intra-articularly.

In the present study, we evaluated the potential of human synovial fluid (HSF), HA and chondroitin sulphate A (CS) to form aggregates with and destabilize cationic and anionic liposomes containing plasmid DNA.

MATERIALS AND METHODS

Liposomes. Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), dioleoyltrimethylammonium propane (DOTAP) and disteoylphosphatidylethanolaminoyl poly(ethylene) glycol (DSPE-PEG $M_n=5000$) were

obtained from Avanti Polar lipids, Alabaster, AL, USA. Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG), were supplied by Northern Lipids, Vancouver, B.C, Canada. The lipids were dissolved in anhydrous CHCl_3 , mixed in the appropriate ratios (DOPE:DOTAP at a molar ratio of 1:1, DOPE:DOTAP containing 10 mol % of DSPE-PEG₅₀₀₀, and DPPC-DMPG at a molar ratio of 9:1), and thin films were formed by rotary evaporation under vacuum in round-bottomed flasks at 65°C. Liposomes were prepared by hydration of the lipid-phospholipid film with phosphate buffered saline (10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.85% w/v NaCl) for 30 min at 25°C, followed by a vigorous agitation at 65°C for 60 sec. The diameter of the liposomes was reduced by sonication in a bath sonicator (45W) for 20 min at 25°C.

Analytical procedures. Liposome particule diameter was determined by photon correlation spectroscopy in a Coulter 4N at a measurement angle of 90° and at a temperature of 23°C. ζ potential was determined by Doppler electrophoretic light-scattering in a Coulter DELSA 440SX at a temperature of 23°C. Appropriate standards were used to calibrate the instruments prior to liposome measurements.

Synovial fluid, hyaluronic acid and chondroitin sulfate A. Human synovial fluid (HSF) was supplied by Shriner's Hospital from patients with juvenile rheumatoid arthritis and stored at -20°C. The HSF was thawed, spun at 13,000 rpm for 10 min to sediment any particulate material and kept on ice. HA and CS were supplied by Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA, and solutions were prepared in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4, containing 0.85% w/v NaCl.

Incorporation of plasmid DNA in cationic liposomes. Plasmid pBR322 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated with cationic DOPE:DOTAP liposomes (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) prepared with or without 10 mol% of DSPE-PEG₅₀₀₀ at 85°C, for 30 min. Bovine pancreatic DNase I (supplied by Boehringer Manneheim GmbH, Mannheim, Germany) was added to each plasmid DNA liposomal mixture (80 U), after which the preparations were incubated at 37°C for 60 min in order to remove non-incorporated DNA. DNase I was then inactivated by incubation at 85°C, for 5 min. Cationic or anionic liposomes containing plasmid pBR322 were incubated with 50% v/v HSF, HA (2.2 mg/ml final concentration), or CS (0.042 mg/ml) at 37°C for 10, 20 or 30 min. The apparent liposome diameter (aggregation) and ζ potential were determined for the different liposomal preparation at each time interval. Plasmid DNA release after incubation of these liposomes in HSF, HA or CS, was determined by fluorescent analysis at excitation wavelength of 520 nm and emission wavelength of 625 nm, using ethidium bromide.

Incorporation of plasmid DNA in anionic liposomes. Anionic DPPC:DMPG liposomes (10 $\mu\text{mol}/\text{ml}$) were microfluidized (13,000 psi at 60°C, 3 cycles of 5 min), and used to generate dehydrated-rehydrated vesicles (DRV) (11). DPPC:DMPG small unilamellar vesicles (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were mixed with plasmid pBR322 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and freeze-dried overnight. The dry powder was then rehydrated in a control fashion using 0.1 ml of distilled water and 0.1 ml of 4.5 mM sodium phosphate buffer at pH 7.4, containing 0.85% NaCl and 0.02% MgCl₂, vortexed gently and kept at room temperature for 30 min. The suspension consisting of liposome-incorporated plasmid pBR322 and free DNA was incubated with 80 units of DNase for 60 min at 37°C, for complete removal of non-incorporated DNA material. DNase I was then inactivated by incubation

at 85°C, for 5 min. The liposomal pellet was washed in 8 ml PBS by centrifugation and suspended in 1 ml PBS. Bile salt sodium deoxycholate (10 mM final concentration) was incubated with each of the liposomal preparations for 30 min at room temperature to ensure liposomal membrane destabilization. Determination of plasmid DNA entrapment was carried-out by fluorescent analysis using ethidium bromide at excitation wavelength of 520 nm and emission wavelength of 625 nm.

Effect of liposome size on their stability in HA or CS. The apparent liposome diameter (aggregation) and ζ potential were determined after sonicating cationic DOPE:DOTAP liposomes, and anionic DPPC:DMPG liposomes in a bath sonicator (45W) for 20 min at 25°C. Cationic or anionic liposomes were then incubated for 30 min at 37°C in HA (2.2 mg/ml final concentration), or CS (0.042 mg/ml final concentration).

RESULTS

Liposome stability in HSF, HA and CS . Cationic DOPE:DOTAP liposomes have considerably enlarged in size in following incubation in HSF, HA or CS from a mean diameter of 150 nm to \approx 4500 nm (Figure 1A). This was accompanied by a significant reduction in liposomal ζ potential from values of +31.6 mV to -35 mV, -21.3 mV and -10.0 mV after 30 min incubation in HSF, HA and CS respectively (Figure 1B). However, no significant changes in the apparent liposomes diameter (202 nm compared to 210 nm) and ζ potential (-2.61 mV compared to -5.67 mV) were observed for cationic DOPE:DOTAP:DSPE-PEG₅₀₀₀ liposomes following their incubation in HSF, HA and CS (Figure 1B). The presence of DSPE-PEG₅₀₀₀ on the surface of cationic DOPE:DOTAP liposomes significantly inhibited aggregation in the presence of human synovial fluid, HA or CS.

Furthermore, incubation of anionic DPPC:DMPG liposomes in HSF, HA and CS resulted in no significant changes in mean diameters (402 nm compared to \approx 446 nm), or liposome ζ potential (-15.8 mV compared to -16.5 mV (Figure 1A-B).

Liposomal retention of plasmid DNA. Incubation of cationic DOPE:DOTAP-pBR322 complexes or DOPE:DOTAP-DSPE:PEG₅₀₀₀-pBR322 complexes in HSF, HA and CS, resulted in approximately 90-100% release of incorporated plasmid DNA, compared to approximately 3-6% release of incorporated plasmid DNA from anionic DPPC:DMPG liposomes (Figure 1C).

Effects of sonication on liposome stability. Incubation of unsonicated or sonicated cationic DOPE:DOTAP liposomes at 37°C in the presence of HA, resulted in approximately a 14-fold increase in their mean diameters (341 nm compared to 4756 nm for the unsonicated DOPE:DOTAP liposomes, and 171 nm compared to 2456 nm for the sonicated form). In addition, a similar significant decrease in liposomal ζ potential of the unsonicated or sonicated cationic DOPE:DOTAP liposomes, was observed following their incubation in HA (+33 mV compared to -26 mV). Incubation of unsonicated or sonicated cationic DOPE:DOTAP liposomes in CS, resulted in about a 5-fold increase in their mean diameters (Tables 1-2). These changes were accompanied by no dramatic changes in liposomal ζ potential after incubating sonicated or unsonicated DOPE:DOTAP liposomes in the presence of CS (-10.2 mV for unsonicated DOPE:DOTAP liposomes compared to -10.4 mV for the sonicated form). In addition, sonicated or unsonicated anionic DPPC:DMPG liposomes, showed no significant aggregation or change in ζ potential after incubating them at 37°C in the presence of HA or CS (Tables 1-2).

DISCUSSION

The results of this study have demonstrated that cationic DOPE:DOTAP liposomes aggregate with and are destabilized in the presence of human synovial fluid

(HSF), hyaluronic acid (HA) and chondroitin sulfate A (CS). Positively charged liposomes are known to interact with and be destabilized by anionic proteins after systemic (12) or oral (13) administration. The aggregation of cationic liposomes by anionic proteins to give micron-sized particles, rather than opsonization itself, may be crucial given that the diameter for efficient endocytosis is of the order of 100-150 nm. Studies have shown that buccopharyngeal wash, which contains anionic mucoproteins and mucopolysaccharides, appears to be particularly effective in aggregating cationic liposomes (14).

In this study, DSPE-PEG₅₀₀₀ appears to be effective in reducing the aggregation of cationic DOPE:DOTAP liposomes in HSF, and by anionic mucopolysaccharides HA and CS. However, DSPE-PEG₅₀₀₀ did not significantly inhibit the release of incorporated plasmid DNA from cationic DOPE:DOTAP liposomes. Although in the presence of amphiphilic PEG small molecules at the surface of the liposome remain inaccessible to proteins in the solvent phase, the linear nature of anionic HA and CS molecules indicates that they may interact with cationic lipids at the liposome surface by interdigitating between the poly(ethylene glycol) arms and inducing the release of incorporated plasmid DNA from cationic liposomes.

The function of hyaluronic acid in synovial fluid is not certain, it may lubricate the synovial membrane itself, but in cartilage it plays an essential role in the aggregation of proteoglycans and it is mostly present not in free state but as a component of proteoglycan aggregates. Since hyaluronic acid can form pro-inflammatory complexes with polycations (10), HA molecules may compete with DNA for cationic lipids DOTAP, resulting in the formation of HA-DOTAP complexes. Such complexes may be

responsible, at least in part, for the low levels of gene expression and induction of inflammation following intra-articular injection (8). In addition, the stability of cationic DOPE:DOTAP liposomes or anionic DPPC:DMPG liposomes toward HA or CS appears to be independent of the liposome diameter (aggregation) and related to liposome surface charge (ζ potential).

Cortisol palmitate has been found to be efficiently incorporated and retained by DPPC liposomes under physiological conditions. Studies have demonstrated that intra-articular injections of liposomal cortisol palmitate was effective in reducing the temperature and swelling of an experimental acute arthritis in the rabbit knee joint (9). Furthermore, no anti-inflammatory activity or proinflammatory properties were observed with liposomal epicortisol palmitate when injected into normal rabbit knee joint (15).

Cationic liposomes are considerably destabilized and biologically incompatible in the human synovial fluid environment, which is rich in negatively charged macromolecules such as HA and CS, extracellular matrix components, lipoproteins, and cells. These results led us to propose that anionic liposomes would appear much more stable carriers than cationic liposomes for intra-articular gene therapy with plasmid DNA vectors.

REFERENCES

1. Evans CH, Robbins PD. Progress toward the treatment of arthritis by gene therapy. *Ann. Med* 1996;27:543-546.
2. Canonico AE, Plitman JD, Conary JT, Meyrick BO, Brigham KL. No lung toxicity after repeated aerosol or intravenous delivery of plasmid-cationic liposome complexes. *J. Appl. Physiol* 1994;77:415-419.

3. Alton EW, Gebbes DM. Gene therapy for cystic fibrosis: a clinical perspective. *Gene Ther* 1995;2:88-95.
4. Hofland H, Huang L. Inhibition of human ovarian carcinoma cell proliferation by liposome-plasmid DNA complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 1995;207:492-496.
5. Lesoon-Wood LA, Kim WH, Kleinman HK, Weintraub BD, Mixson AJ. Systemic gene therapy with p53⁻ reduces growth and metastases of a malignant human breast cancer in nude mice. *Hum. Gene Ther* 1995;6:395-405.
6. Nesle FO, Mitra RS, Bennett CF, Chan H, Nickoloff BJ. *J. Invest. Dermatol* 1994;103:569-575.
7. Otani K, Nita I, Macaulay W, Georgescu HI, Robbins PD, Evans CH. Suppression of antigen-induced arthritis in rabbits by ex vivo gene therapy. *J. Immunol* (in press).
8. Nita S, Ghivizzani C. Direct gene delivery to synovium. An evaluation of potential vectors in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 1996;39:820-828.
9. Phillips NC, Page Thomas DP, Knight CG, Dingle JT. Liposome-incorporated corticosteroids. II. Therapeutic activity in experimental arthritis. *Ann. Rheum. Dis* 1979;38:553-557.
10. Page Thomas DP. Aspects of synovial biodegradation. In, *Experimental models of chronic inflammatory diseases*. Edited by Glynn LE and Schlumberger HD, Springer, Berlin, 1977.
11. Kirby C, Gregoriadis G. Dehydration-Rehydration vesicles: A simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology* 1984;184:979-989.

- 12.Senior JH, Trimble KR, Maskiewicz R. Interaction of positively charged liposomes with blood: implications for their application in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1991;1070;173-179.
- 13.Arien A, Goigoux C, Baquey C, Dupuy B. Study of in vitro and in vivo stability of liposomes loaded with calcitonin or indium in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 1993;53:1279-1290.
- 14.Phillips NC, Heydari C. Modulation of cationic liposomal zeta potential and liposome-protein interaction by amphiphilic poly(ethylene glycol). *Pharmaceutical Sciences* 1996;2:73-76
- 15.Shaw IH, Knight CG, Dingle JT. Liposomal retention of a modified anti-inflammatory steroid. *Biochem J* 1976;158:473-476.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Dr. Robin Poole from Shriners' Hospital, Montreal, Quebec, Canada, for providing samples of human synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. We wish to thank Dr. Philippe Raymonde of the Institut Armand Frappier (IAF), Montreal, Quebec, Canada, for the pBR322 plasmid construct.

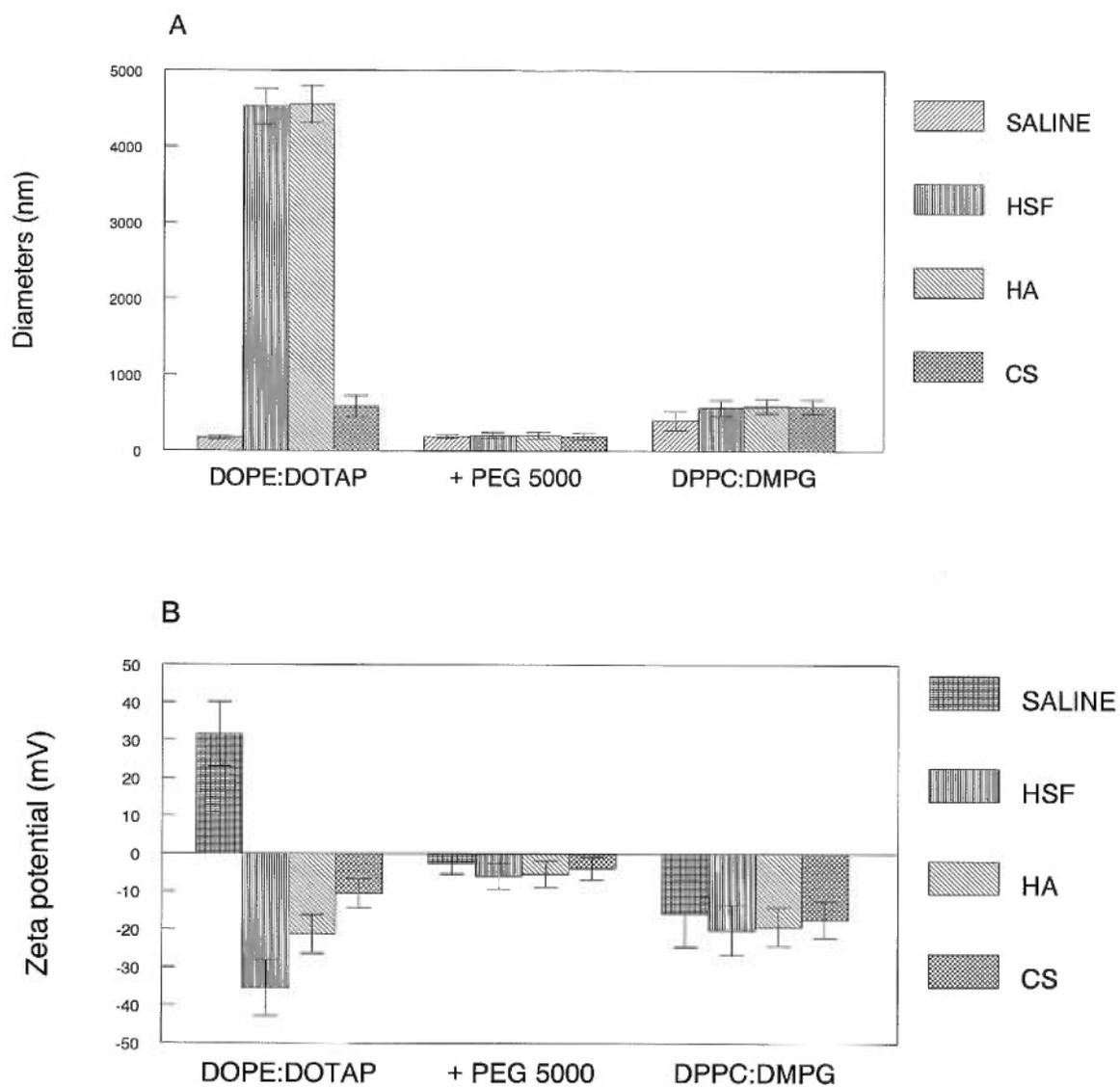
LEGENDS

Figure 1. Effects of HSF, HA or CS on cationic or anionic liposome-plasmid DNA diameter, ζ potential and plasmid DNA release. **A**, Cationic DOPE:DOTAP (1:1 molar ratio) liposomes with or without 10 mol% of DSPE-PEG₅₀₀₀ were prepared by hydration of thin films of lipid followed by sonication. DPPC:DMPG (9:1 molar ratio) liposomes were prepared by hydration of thin films of lipid followed by microfluidization (13,000 psi at 60°C, 3 cycles of 5 min). For the cationic liposomes, plasmid pBR322 (25 μ g/ml) was mixed with DOPE:DOTAP liposomes at 85°C for 30 min. For the anionic liposomes DPPC-DMPG liposomes, 25 μ g/ml of plasmid pBR322 were mixed with 250 μ g/ml of these liposomes and freeze-dried overnight. The dry powder was then rehydrated in a controlled fashion (11). Cationic DOPE:DOTAP liposomes, DOPE:DOTAP containing 10 mol% DSPE-PEG₅₀₀₀ liposomes or anionic DPPC-DMPG liposomes (250 μ g/ml) containing plasmid pBR322, were then incubated with 50% v/v human synovial fluid, HA (2.2 mg/ml final concentration), or CS (0.042 mg/ml final concentration) at 37°C for 30 min. The apparent liposome diameter (aggregation) were determined for the different liposome preparations by photon correlation spectroscopy in a Coulter 4N at a measurement angle of 90° and at a temperature of 23°C. **B**, The apparent liposome zeta (ζ) potential were determined by electrophoretic light-scattering in a Coulter DELSA 440SX at a temperature of 23°C. **C**, Determination of plasmid DNA release after incubation of cationic DOPE:DOTAP liposomes, DOPE:DOTAP containing 10 mol% DSPE-PEG₅₀₀₀ liposomes (250 μ g/ml) containing plasmid pBR322 (17.5 μ g/ml) or anionic DPPC-DMPG liposomes (250 μ g/ml) containing plasmid pBR322 (12.3 μ g/ml), in the presence of HSF, HA or CS was carried-out by fluorescent

analysis using ethidium bromide (5 µg/ml final concentration) at excitation wavelength of 520 nm and emission wavelength of 625 nm. Bars show the mean \pm s.d of three experiments. $P < 0.05$, by Student's t-test.

Table 1. Effects of linear anions HA or CS on unsonicated cationic or anionic liposome-plasmid DNA diameter and ζ potential. ^aDOPE:DOTAP liposomes were incubated with plasmid pBR322 at a weight ratio of 10:1 for 30 min at 85°C. ^aMicrofluidized DPPC-DMPG liposomes were mixed with plasmid pBR322 at a weight ratio of 10:1 and used to from dehydrated-rehydrated vesicles (11). ^bCationic or anionic liposome-plasmid DNA were then sonicated in a bath sonicator for 20 min at 25°C and incubated with HA (2.2 mg/ml final concentration or CS (0.042 mg/ml final concentration) for 30 min at 37°C. Values are mean \pm s.d. of three experiments.

Table 2. Effects of linear anions HA or CS on sonicated cationic or anionic-plasmid DNA diameter and ζ potential. ^aDOPE:DOTAP liposomes were incubated with plasmid pBR322 at a weight ratio of 10:1 for 30 min at 85°C. ^aMicrofluidized DPPC-DMPG liposomes were mixed with plasmid pBR322 at a weight ratio of 10:1 and used to from dehydrated-rehydrated vesicles (15). ^bCationic or anionic liposome-plasmid DNA were then sonicated in a bath sonicator (45W) for 20 min at 25°C and incubated with HA (2.2 mg/ml final concentration or CS (0.042 mg/ml final concentration) for 30 min at 37°C. Values are mean \pm s.d. of three experiments.



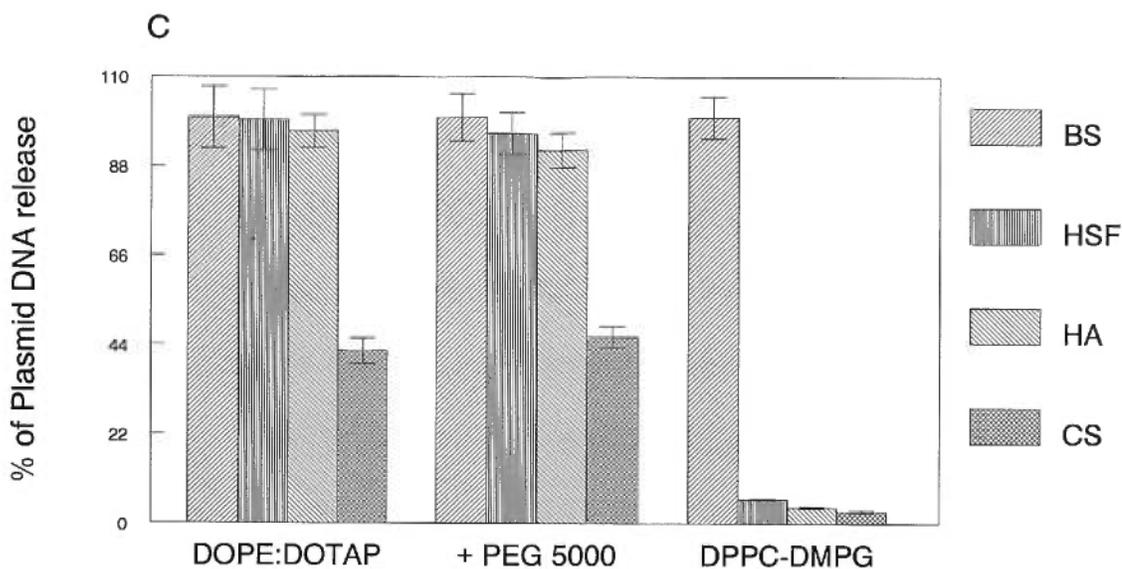


Table 1. Effect of linear anions HA or CS on unsonicated cationic or anionic liposome-plasmid DNA diameter and ζ potential.

Linear anions ^b	DOPE:DOTAP-plasmid DNA ^a		DPPC-DMPG-plasmid DNA ^a	
	Diameters (nm)	ζ potential (mV)	Diameters (nm)	ζ potential (mV)
Control	340.9 ± 65.2	+33.0 ± 8.6	402.6 ± 78.2	-16.3 ± 5.2
HA	4756.2 ± 00.1	-25.5 ± 10.4	446.8 ± 86.2	-17.3 ± 6.5
CS	1552.4 ± 26.1	-10.2 ± 6.6	453.6 ± 91.1	-17.1 ± 6.1

Table 2. Effect of linear anions HA or CS on sonicated cationic or anionic-plasmid DNA diameter and ζ potential.

Linear anions ^b	DOPE:DOTAP-plasmid DNA ^a		DPPC-DMPG-plasmid DNA ^a	
	Diameters (nm)	ζ potential (mV)	Diameters (nm)	ζ potential (mV)
Control	170.7 \pm 30.1	+32.6 \pm 8.1	254.1 \pm 59.1	-15.9 \pm 4.2
HA	2456.1 \pm 200.4	-25.5 \pm 10.2	286.4 \pm 62.2	-16.8 \pm 5.9
CS	946.2 \pm 100.2	-10.4 \pm 6.1	282.9 \pm 64.5	-16.3 \pm 5.3